N° D'ORDRE :
68

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

JACQUES **BARAUD**

1re THÈSE. — ETUDE DES DÉRIVÉS NATURELS DE L'ACIDE TARTRIQUE.

2e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 17 mars 1954 devant la Commission d'examen.

MM. GENEVOIS, Professeur..... *Président.*
AVEL, Professeur..... } *Examinateurs.*
RIBEREAU-GAYON, Professeur. }

PARIS
MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN

1954

FACULTÉ DES SCIENCES

Nom du candidat : **BARAUD.**
Prénom : **Jacques.**

Date de la soutenance : 17 mars 1954.

Numéro d'ordre : 68.

BARAUD (Jacques). — Etude des dérivés naturels de l'acide tartrique. *Paris*, Masson, 1954. In-8°, 71 p., 16 fig.

Th. Sc. Nat. Bordeaux, 1954. N° 68.

BARAUD (Jacques). — Etude des dérivés naturels de l'acide tartrique. *Paris*, Masson, 1954. In-8°, 71 p., 16 fig.

Th. Sc. Nat. Bordeaux, 1954. N° 68.

BARAUD (Jacques). — Etude des dérivés naturels de l'acide tartrique. *Paris*, Masson, 1954. In-8°, 71 p., 16 fig.

Th. Sc. Nat. Bordeaux, 1954. N° 68.

BARAUD (Jacques). — Etude des dérivés naturels de l'acide tartrique. *Paris*, Masson, 1954. In-8°, 71 p., 16 fig.

Th. Sc. Nat. Bordeaux, 1954. N° 68.

N° D'ORDRE :
68

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

JACQUES **BARAUD**

1re THESE. — ETUDE DES DÉRIVÉS NATURELS DE L'ACIDE TARTRIQUE.

2e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 17 mars 1954 devant la Commission d'examen.

MM. GENEVOIS, Professeur..... *Président.*
AVEL, Professeur..... } *Examinateurs.*
RIBEREAU-GAYON, Professeur. }

PARIS
MASSON ET Cie, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN

1954

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DES SCIENCES

	MM.	
Doyen	BRUS	
Doyens honoraires.	PADÉ	Recteur honoraire de l'Académie d'Aix.
	PICART	Membre de l'Institut.
	DUPONT	Directeur de l'Ecole Normale Supérieure.
	CHAINE	
	MERCIER	
Professeurs honoraires	PADÉ	Recteur honoraire de l'Académie d'Aix.
	BOUNHIOL	
	DEVAUX	Membre de l'Institut.
	DUPONT	Directeur de l'Ecole Normale Supérieure.
	PICART	Membre de l'Institut.
	DAURE	Recteur de l'Académie de Caen.
	CHAINE	
	KASTLER	Professeur à la Sorbonne.
	QUELET	Professeur à la Sorbonne.
Professeurs	MERCIER	Radioélectricité.
	MILLOUX	Calcul infinitésimal.
	DANGEARD	Botanique.
	GENEVOIS	Chimie biologique et Physiologie végétale.
	CAU	Physique expérimentale.
	BRUS	Chimie.
	AVEL	Zoologie et Physiologie animale.
	ROUSSET	Physique générale.
	ROGER	Mécanique rationnelle.
	WEILL	Anatomie comparée et Embryogénie.
	SERVANT	Physique.
	DUFRESNOY	Mathématiques générales.
	LAFON	Physiologie générale.
	DAVID	Biologie végétale.
	PISOT	Calcul des probabilités.
	BOUNHIOL	Biologie animale.
	SCHOELLER	Géologie.
	GAY	Minéralogie.
	CALAS	Chimie organique.
	GUIZONNIER	Physique.
	ALLARD	Chimie.
	LAMARE	Géologie.
	PATY	Chimie.
	COLMEZ	Mathématiques.
	PACAULT	Chimie physique.
	Mlle JOSIEN	Chimie minérale.
	RIBEREAU-GAYON	Oenologie et chimie agricole.
	CAMBAR	Biologie générale.
Maître de conférences honoraire	de PUYMALY	
Maîtres de conférences	MALVESIN-FABRE	Botanique.
	VIGNEAUX	Géologie.
Secrétaire	ARTIGUELONG	

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

A MA FEMME

A MA MÈRE, A MON PÈRE

A MES FRÈRES ET A MES BELLES-SŒURS

A MA FAMILLE

A MES AMIS

ÉTUDE DES DÉRIVÉS NATURELS DE L'ACIDE TARTRIQUE

Par J. BARAUD

AVANT-PROPOS

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Bordeaux.

Commencées en 1948, nos recherches ont été menées pendant trois années sous l'égide de M. le professeur J. Ribereau-Gayon ; nous le prions de trouver ici l'hommage de notre profonde gratitude pour l'encouragement qu'il nous a prodigué et l'intérêt qu'il a bien voulu témoigner à notre travail.

Pendant les trois dernières années de notre expérimentation, nous avons retrouvé avec joie notre Maître, M. le professeur L. Genevois ; nous sommes heureux de lui exprimer ici nos sentiments les plus sincères de profonde et respectueuse reconnaissance pour ses inépuisables conseils, et combien il nous est agréable de travailler sous sa bienveillante autorité.

Nous remercions M. le professeur Avel de l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de juger notre travail.

Notre gratitude va aussi à Mlle Josien, professeur de Chimie Physique et à M. F. Tayeau, professeur de chimie biologique à la Faculté de Médecine, qui ont mis avec tant d'amabilité leur laboratoire à notre disposition.

Nous voulons enfin exprimer notre reconnaissance à M. E. Peynaud, ingénieur-docteur, et à M. P. Creach, pharmacien, docteur ès Sciences ; nos amicales discussions ont été souvent fertiles et nous ont ouvert certaines voies que nous n'aurions peut-être pas entrevues seul.

SOMMAIRE

Pages

AVANT-PROPOS 1

PREMIÈRE PARTIE. — L'ACIDE DIHYDROXYMALÉIQUE

Chapitre premier. — Propriétés physico-chimiques (Spectre d'absorption, *p*H, équilibre céto-énol, potentiel d'oxydo réduction). 6

Chapitre II. — Etude des produits d'oxydation 13

Chapitre III. — Etude des produits de décarboxylation 16

DEUXIÈME PARTIE. — L'ACIDE DIOXYTARTRIQUE

Chapitre premier. — Etude de la décarboxylation 21

Chapitre II. — Etude de l'oxydation 24

Chapitre III. — La réaction dite « de la Tartrazine » 26

Chapitre IV. — Action du cuivre et du fer 37

TROISIÈME PARTIE. — EVOLUTION DES SOLUTIONS DE TARTRATE FERREUX

Chapitre premier. — Techniques de dosage utilisées 46

Chapitre II. — Etude des solutions 49

QUATRIÈME PARTIE. — LES PRODUITS D'OXYDATION DE L'ACIDE TARTRIQUE DANS LE CAS DES VINS

Chapitre premier. — Techniques utilisées 57

Chapitre II. — Résultats expérimentaux 59

CINQUIÈME PARTIE. — LE « CORPS R » DES VINS

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES 69

BIBLIOGRAPHIE 70

INTRODUCTION

L'acide tartrique est un produit stable, en solution aqueuse et résiste à l'action d'oxydants comme l'eau oxygénée ou l'oxygène de l'air; il en est tout autrement lorsque la solution contient un peu de sel ferreux. C'est Fenton qui, en 1894, signala le premier l'oxydation de l'acide tartrique par l'eau oxygénée en présence de sel ferreux; en traitant par H_2O_2 une solution saturée d'acide tartrique ayant dissous un poids de fer réduit égal au 1/10 du poids de l'acide, Fenton observa l'apparition d'un pouvoir réducteur subsistant après précipitation du fer par le ferrocyanure, tandis que la solution avait pris une teinte verdâtre. En traitant ensuite par l'acide sulfurique, à 0°, il obtint un précipité cristallin, qu'il identifia comme étant l'acide dihydroxymaléique.

Cet acide, en solution aqueuse, précipite par les sels de baryum et d'argent et par le sous-acétate de plomb; il est réducteur et donne une oxime avec l'hydroxylamine. Fenton reconnut également que ses solutions aqueuses sont instables, dégagent de fines bulles de gaz et après quelques heures, ont perdu leurs propriétés initiales. Cette décomposition est très accélérée par chauffage vers 60°; la solution est alors très peu acide mais présente une intense réaction des aldéhydes; Fenton montra qu'il se forme un peu d'acide glyoxylique mais surtout de l'aldéhyde glycolique. Un excès de sel ferrique oxyde l'acide dihydroxymaléique en acide dioxytartrique.

En 1902, Fenton, en saturant de chlore une solution tartrique renfermant une trace de sel ferreux, a montré qu'il se formait principalement de l'acide glyoxylcarbonique (propanonaloïque) qu'il a identifié par sa dioxime et par ses dérivés hydraziniques. En l'oxydant par l'oxyde de cuivre, il a obtenu l'acide mésoxalique. L'auteur a montré que quand on sature de chlore la solution tartrique il apparaît d'abord un pouvoir réducteur dû à l'acide dihydroxymaléique; ce pouvoir réducteur disparaît ensuite; le Fe^{+++} formé repasse alors à l'état réduit tandis qu'apparaît l'acide dioxytartrique, puis ce dernier se décarboxyle en acide glyoxylcarbonique.

Fenton et ses collaborateurs ont consacré de nombreux mémoires à la préparation de ces composés et de leurs dérivés hydraziniques.

Neuberg et Schwenk, en 1915, ont montré que l'acide dihydroxymaléique est en quelque sorte fermentescible puisqu'il est attaqué par la carboxylase de la levure, avec formation de 2 molécules de gaz carbonique et d'une molécule d'aldéhyde glycolique, caractérisé par son osazone; ils ont indiqué en même temps l'instabilité de cet acide dihydroxymaléique puisqu'en voulant préparer son osazone ils ont aussi obtenu celle de l'acide hydroxypyruvique.

Wieland et Franke, en 1928, au sein d'une étude générale de l'oxy-

dation des acides organiques catalysés par les sels ferreux, ont repris la question de l'oxydation de l'acide tartrique par l'oxygène gazeux. Ils ont eux aussi obtenu l'acide dihydroxymaléique, puis l'acide dioxytartrique. Ils ont montré que le *p*H optimum était voisin de 4-5; mesurant les vitesses de réaction et le quotient $\frac{O_2 \text{ absorbé}}{CO_2 \text{ dégagé}}$, ils ont montré que la vitesse de réaction est proportionnelle à la pression d'oxygène; cette vitesse est également fonction, dans une certaine mesure, de la température, de la concentration en fer, mais on peut penser que les seules mesures de gaz absorbé ou dégagé sont insuffisantes à rendre compte des transformations prenant naissance dans le milieu, qui portent sur plus de deux sortes de molécules (en fait nous verrons que 4 molécules au moins réagissent simultanément).

Wieland et Franke ont aussi montré que l'acide dihydroxymaléique se décarboxyle et conduit quantitativement à l'aldéhyde glycolique, dans l'azote, même en l'absence de fer. L'oxydation aboutit d'une part à l'acide glyoxylcarbonique, d'autre part à l'acide dioxytartrique; ce dernier, qui se forme principalement, est également instable et conduit pour un tiers à l'acide mésoxalique, pour deux tiers à l'acide oxalique. Schmalfuss, en 1923, décèle l'acide dihydroxymaléique dans une Papavéracée, *Glaucium luteum*, où il en trouve 1,07 p. 100 des acides totaux, soit 40 mg par kilogramme de plante. Avec Barthmeyer, il poursuit l'étude de cet acide en 1926, et ces auteurs rejoignent les conclusions de Neuberg et Schwenk, en montrant que l'acide dihydroxymaléique se décompose en aldéhyde glycolique et CO_2 à 100°, tandis qu'à 70° il conduit à l'acide tartronique.

Il est évident que ni Fenton, cherchant avant tout à isoler des corps, ni Wieland et Franke, opérant sous pression plus ou moins grande d'oxygène, ne pouvaient saisir les réactions dans leurs détails.

En 1914, O. Warburg a montré que les solutions de tartrate ferreux s'oxydent spontanément au contact de l'oxygène de l'air.

Ce sont Genevois et Gay qui, en 1939, ont repris cette étude en opérant sur des solutions de concentrations modérées et par la seule action de l'oxygène atmosphérique. Ces auteurs ont été les premiers à expliciter la notion d'équilibre céto-énol pour l'acide dihydroxymaléique; si on oxyde cet acide par le dichlorophénolindophénol, la réaction est rapide au début et correspond à l'oxydation de la forme énol; puis la réaction se poursuit lentement pendant près d'une heure ce qui correspond au passage de la forme cétone à la forme diénol. Inversement, en présence d'un réactif des fonctions cétones, comme l'hydroxylamine, on aboutit à la formation d'une oxime par rupture de l'équilibre, cette fois dans le sens diénol-cétone. Les auteurs ont montré que l'acide dihydroxymaléique réduit le bleu de méthylène.

Ils ont préparé la dinitrophénylhydrazone de l'acide dihydroxymaléique (P. F : 174°) et la *bis*-dinitrophénylhydrazone de l'acide dioxytartrique (P. F : 225°-226°). Ils ont également préparé les dinitrophé-

nylhydrazones des dérivés d'oxydation et de décarboxylation, en particulier celles de l'acide glyoxylcarbonique (P. F : 273°-274°) et de l'aldéhyde glycolique (P. F : 338°).

Ces travaux ont été interrompus par la guerre; nous avons été heureux de pouvoir les reprendre en 1947.

Comme on le voit d'après cet historique, la question des dérivés de l'acide tartrique a été assez peu étudiée et toujours fragmentairement. Pour notre part, nous avons tenté d'en faire une étude d'ensemble, en appliquant ou en mettant au point des techniques de caractérisation et de dosage pouvant être utilisées dans les milieux biologiques où les corps sont à des concentrations faibles, de l'ordre d'une millimolécule par litre.

Dans une première partie, nous avons étudié les propriétés de l'acide dihydroxymaléique en solution pure (spectre d'absorption, *p*K, équilibre céto-énol, potentiel d'oxydo-réduction) et ses dérivés d'oxydation et de décarboxylation ; l'oxydation nous a permis d'identifier l'acide dioxytartrique, l'acide glyoxylique, l'acide oxalique et le glyoxal. Nous avons étudié la décarboxylation d'une façon quantitative, ce qui nous a permis de suivre l'apparition des corps en C_3, puis en C_2 (aldéhyde glycolique) et de mesurer les vitesses de décarboxylation. Nous avons montré que ces vitesses étaient doublées par la présence d'une trace de cuivre.

Nous avons consacré une deuxième partie aux propriétés de l'acide dioxytartrique en solution simple. L'étude de la décarboxylation nous a conduit à des corps en C_3 (acide glyoxylcarbonique) et en C_2 (glyoxal) mais avec des vitesses environ 7 fois moins grandes que dans le cas de l'acide dihydroxymaléique. L'oxydation nous a conduit principalement à l'acide mésoxalique et à l'acide oxalique. Nous avons aussi étudié la réaction de la tartrazine, décrite par Ziegler et Lacher en 1887, et qui consiste en la formation d'un colorant jaune par action de la *p*.sulfophénylhydrazine sur l'acide dioxytartrique ; nous avons précisé les conditions de chauffage, de *p*H, de spécificité et de concentration, montrant que la réaction suit la loi de Beer-Lambert et permet un dosage précis de l'acide dioxytartrique. Nous servant de cette technique, nous avons étudié l'instabilité de cet acide, en fonction du *p*H et de la catalyse par le cuivre et le fer.

Connaissant le comportement en solution simple des acides dioxytartrique et dihydroxymaléique, nous avons suivi, dans la troisième partie, l'évolution des solutions de tartrate ferreux, en fonction du temps, de la température et de l'éclairement ; nous avons ainsi constaté l'apparition des acides dihydroxymaléique et dioxytartrique, des corps en C_3 comme les acides glyoxylcarbonique et mésoxalique et des corps en C_2 comme l'acide glyoxylique, l'aldéhyde glycolique et le glyoxal qui sont finalement les produits d'accumulation, les résidus de la dégradation de l'acide tartrique.

Dans une quatrième partie, nous avons recherché ces mêmes corps

dans un milieu naturel : le vin. Nous avons eu recours à la précipitation fractionnée des dinitrophényl-hydrazones, dosées par le trichlorure de titane. Nous avons ainsi dosé des aldéhydes (aldéhyde glycolique et glyoxal), des acides-aldéhydes comme l'acide glyoxylique et des diacides-cétones (acide mésoxalique). Nous avons constaté que les vins ne renferment ni acide dihydroxymaléique ni acide dioxytartrique ; par contre ils contiennent un « corps R », encore mal connu, sans doute dérivé des glucides, très voisin par ses propriétés de la réductone. Nous lui avons consacré quelques pages, vue son importance dans la question du potentiel d'oxydo-réduction des vins.

L'étude des dérivés naturels de l'acide tartrique, en dehors des connaissances qu'elle peut apporter en chimie et en œnologie, présente un intérêt biologique plus général ; certains de ces dérivés sont des constituants essentiels ; c'est ainsi que l'acide glyoxylique est aujourd'hui considéré comme une des bases fondamentales de la biosynthèse, étant le précurseur dans l'organisme animal du glycocolle, et par conséquent de la créatine.

PREMIÈRE PARTIE

L'ACIDE DIHYDROXYMALÉIQUE

Warburg (1914), Genevois et Gay (1939) ont montré qu'il suffit d'abandonner à l'air une solution N/10 en acide tartrique, N/1 000 en sel ferreux, pour voir apparaître un certain pouvoir réducteur au dichlorophénolindophénol ; ce pouvoir réducteur est dû à la formation d'acide dihydroxymaléique $CO_2H.C(OH)=C(OH).CO_2H$.

Nous allons tout d'abord étudier les propriétés de cet acide, premier stade de la dégradation de l'acide tartrique.

CHAPITRE PREMIER

PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

L'acide dihydroxymaléique, qui se présente sous forme d'une poudre blanche, est peu soluble dans l'eau, plus soluble dans les alcalis et dans l'alcool.

Spectre d'absorption. — D'après Herbert, Hirst, Percival, Reynolds et Smith, cet acide possède en solution aqueuse une forte bande d'absorption à $\lambda = 290$ mμ, cette bande étant détruite après oxydation en acide dioxytartrique. Nous avons repris cette étude au spectrophotomètre de Beckman avec une solution 2 M. 10^{-5} d'acide dihydroxy-

maléique, c'est-à-dire à 2,96 mg par litre. Nous avons effectivement trouvé (cf. fig. 1) la bande d'absorption à $\lambda = 290$ mμ ; si on ajoute à la solution une goutte d'eau oxygénée, transformant l'acide dihydroxymaléique en acide dioxytartrique, on voit l'absorption diminuer peu à peu ; l'acide dioxytartrique ne présente plus aucune bande d'absorption caractéristique.

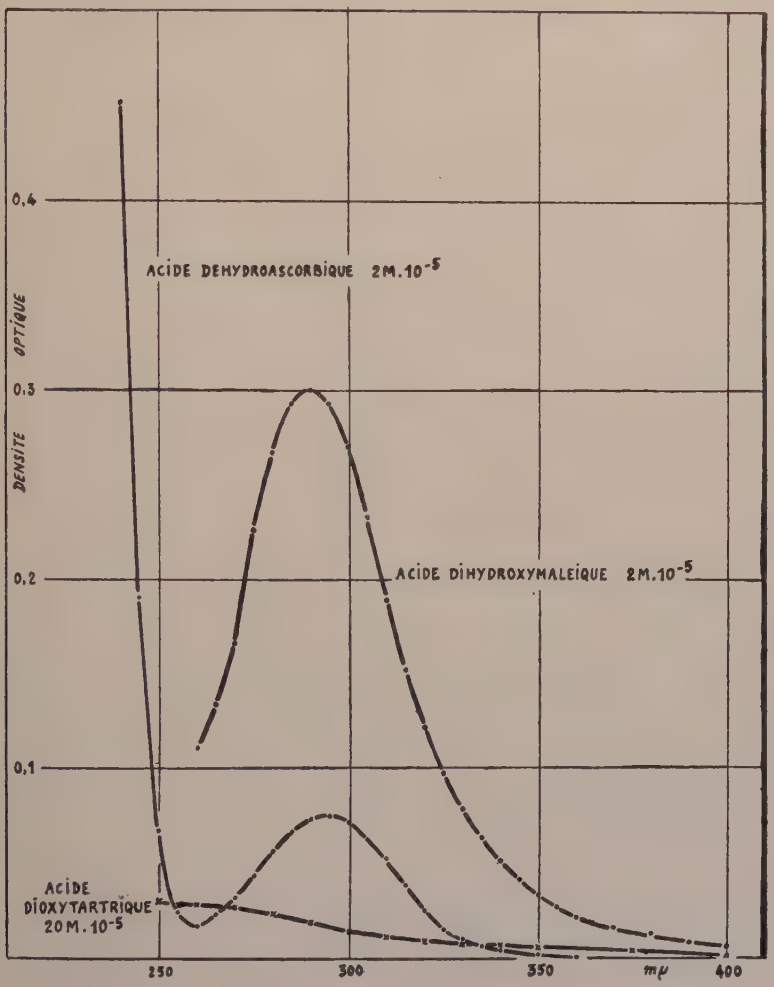


Fig. 1.

Détermination des *p*K. — Si on cherche à titrer par la soude une solution fraîchement préparée d'acide dihydroxymaléique, on peut

doser les deux fonctions acides ; nous avons préparé une solution 1,5 N/100 soit 550 mg pour 500 cm³, que nous avons dosée par la soude N/10 en suivant la réaction au *p*H-mètre.

L'étude de la courbe de neutralisation permet de préciser les valeurs des *p*K des deux fonctions acides, que nous avons trouvées égales à 2,7 et 3,8. L'acide dihydroxymaléique, nous le verrons, existe sous deux formes en équilibre : forme diénolique $CO_2H - C(OH) = C(OH) - CO_2H$ et forme cétonique $CO_2H - CO - CHOH - CO_2H$. Les hydrogènes énoliques sont acides, comme ceux de l'acide ascorbique, mais beaucoup moins fortement. Kumler et Daniels (1935) ont montré que les H énoliques de l'acide dihydroxymaléique ont pour *p*K = 7,85-7,88 et 12,2-12,3, alors que ceux de l'acide ascorbique, d'après Birch et Harris ont pour *p*K = 4,17 et 11,57. Le 3e *p*K, égal à 7,85, explique pourquoi il n'est pas possible d'obtenir un virage net en présence de bromothymol bleu : à *p*H = 7 en effet, une partie des H énoliques est salifiée ; de ce fait, l'équilibre céto-énol est rompu et il apparaît une nouvelle proportion d'H énolique ; dans ces conditions le bromothymol bleu vire au jaune.

Equilibre céto-énol. — La présence d'un équilibre céto-énol dans les solutions d'acide dihydroxymaléique a été explicitée par Genevois et Gay (1939) :

$$CO_2H.C(OH) = C(OH) - CO_2H \rightleftarrows CO_2H.CO - CHOH.CO_2H.$$

Il est aisé de mettre ces deux formes en évidence au sein d'une même solution.

Mise en évidence de la forme cétonique. — Nous avons dosé les carbonyles par la technique à l'hydroxylamine de Bryant et Smith (1935) : à 50 cm³ de solution 1,6 N/100 en ions H^+, ajustée à *p*H = 4,0 nous ajoutons 25 cm³ de chlorhydrate d'hydroxylamine N/10 également amenés à *p*H = 4,0. On attend 20 min, pendant lesquelles on voit le *p*H redescendre lentement. Au bout de ce temps (que nous avons plusieurs fois vérifié être suffisant pour une réaction totale) on titre par la soude l'acide chlorhydrique libéré, correspondant à l'hydroxylamine fixée par les groupes carbonyles ; on trouve ainsi que la solution renferme 8 m. éq de carbonyles/litre, c'est-à-dire qu'elle est 0,8 N/100 en carbonyles. Nous voyons ainsi que tout l'acide dihydroxymaléique a réagi sous forme cétonique, l'équilibre ayant été déplacé dans le sens énol → cétone.

Mise en évidence de la forme diénolique. — La fonction diénol est réductrice ; elle réduit l'iode, le 2.6.dichlorophénolindophénol, la thionine, les sels ferriques ; l'oxydation conduit à l'acide dioxytartrique :

$$CO_2H.C(OH) = C(OH).CO_2H + O \rightarrow CO_2H.CO.CO.CO_2H + OH_2.$$

a) Action de l'iode : Si on cherche à titrer l'acide dihydroxymaléique par l'iode, on constate qu'après une oxydation rapide au début, le virage est fugace et la réaction se poursuit lentement. Nous avons alors opéré par retour : à 20 cm³ de solution d'acide dihydroxymaléique M/200, c'est-à-dire N/100 en H réducteur, nous avons ajouté 50 cm³ iode N/100 et titré l'excès d'iode par $S_2O_3Na_2$ N/100 après des temps variables. La réaction avait lieu à $pH = 6,5$ en tampon phosphaté N/10.

Nous avons ainsi constaté que la réaction est lente (tableau I) et conduit en 1 heure à la consommation de la quantité théorique d'iode. Ensuite, il se fait une réaction secondaire, qui est la décar-

Tableau I

TEMPS EN MINUTES	2	15	30	45	60	90	120	150	180
IODE CONSOMME (m.eq./L.)	5,0	8,0	8,85	9,55	9,95	10,4	10,8	11,25	11,6

boxylation de l'acide dioxytartrique suivie d'une lente oxydation de l'acide glyoxylcarbonique ainsi formé :

$$CO_2H - CO - CO - CO_2H \rightarrow CO_2H - CO - CHO + CO_2$$
$$CO_2H - CO - CHO + H_2O + 2I \rightarrow CO_2H - CO - CO_2H + 2IH.$$

Ainsi tout l'acide dihydroxymaléique a réagi sous forme énol, la moitié réagissant instantanément ; nous nous trouvons donc en présence d'un équilibre céto-énol ; mais nous pensons que l'iode est un catalyseur énergique de transformation de la forme cétone en forme énol et nous avons préféré utiliser le dichlorophénol-indophénol.

b) Action du 2.6.dichlorophénolindophénol : l'emploi de ce colorant nous a permis d'opérer avec plus de rigueur, en évitant l'action de l'oxygène de l'air, le colorant étant conservé en burette automatique sous pression de CO_2 et les dosages se faisant aussi en atmosphère de CO_2.

Si on titre 20 cm³ de solution d'acide dihydroxymaléique N/1 000 préparée depuis une demi-heure par le dichlorophénol-indophénol N/1 000, on constate une réduction instantanée de 4 cm³ du colorant, ce qui correspond à 20 p. 100 de la quantité totale théorique. Si par la suite on ajoute de nouveau 2 cm³ d'oxydant, il se décolore lentement, et ainsi de suite, de plus en plus lentement, jusqu'à concurrence du chiffre normal de 20 cm³.

Nous pouvons en déduire que dans une solution, l'acide dihydroxymaléique existe pour 20 p. 100 à l'état diénolique et pour 80 p. 100 à

l'état cétonique. Ceci n'est vrai que pour une solution préparée depuis un certain temps, 30 min au moins; le pouvoir réducteur instantané est nul sur une solution juste préparée, il croît ensuite et est

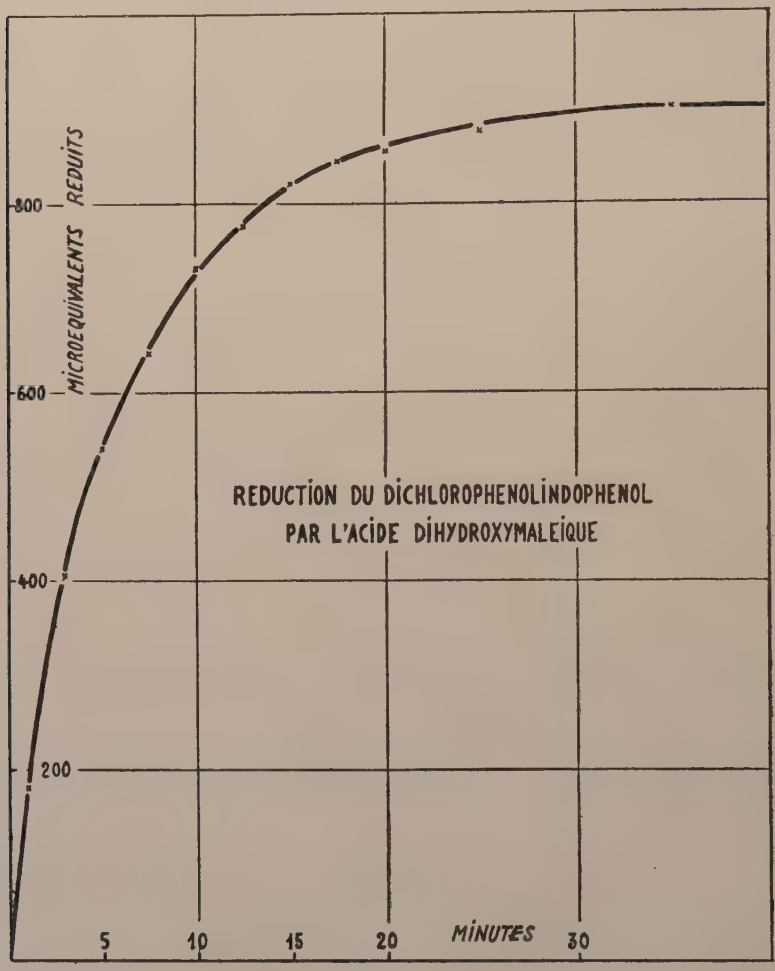


Fig. 2.

maximum au bout de 30 min environ. Ceci nous oblige à admettre qu'à l'état cristallisé, l'acide dihydroxymaléique se trouve entièrement sous forme cétonique. L'expérience suivante nous a permis de le vérifier et de calculer en même temps la vitesse de transformation de la forme cétonique en la forme diénolique.

Dans une cuve à faces parallèles pouvant être fermée, nous avons introduit, sous atmosphère de CO_2, 25 cm³ de dichlorophénolindophénol 0,25 N/1 000, N/10 en tampon phosphaté à pH = 6,5, et 3 cm³ d'acide dihydroxymaléique en solution 0,9 N/1 000 préparée depuis moins de 1 min; nous avons alors suivi la décoloration à l'électrophotomètre pour $\lambda = 436$ mμ. Nous avons en effet été contraint d'opérer en lumière bleue car même à la concentration 0,25 N/1 000, le colorant absorbe beaucoup trop en lumière jaune.

Nous avons obtenu la courbe de la figure 2; courbe régulière de réaction mono-moléculaire représentant le passage de la forme cétonique à la forme diénolique réductrice; nous exprimerons la vitesse de cette transformation par le temps de demi-réaction, qui est de 4 min environ, la réaction demandant 30 min pour être totale à moins de 1 p. 100 près.

Avant de faire ces expériences, nous avions vérifié que l'absorption du dichlorophénolindophénol à pH = 6,5 est constante, au moins pendant 1 heure. Par contre nous n'avons pas pu opérer en milieu acide, car le colorant, qui est alors rouge et que nous observions en lumière jaune (raie D du sodium), se décompose rapidement et on observe une chute d'absorption de 16,6 p. 100 en 5 min, 33 p. 100 en 15 min, ce qui rend toute mesure impossible.

c) Action de la thionine : La thionine oxyde également l'acide dihydroxymaléique, mais beaucoup plus lentement que le dichlorophénolindophénol; aussi, étant donnée la facilité avec laquelle l'acide dihydroxymaléique se décarboxyle, nous n'avons pas cru devoir utiliser ce colorant.

d) Action des sels ferriques : le sulfate ferrique oxyde l'acide dihydroxymaléique :

$$CO_2H - C(OH) = C(OH) - CO_2H + 2Fe^{+++} \rightarrow 2Fe^{++} + 2H^+ + CO_2H - CO - CO - CO_2H$$

Au fur et à mesure qu'on ajoute le sel ferrique, on observe tout au début une teinte bleuâtre, puis jaune intense lorsqu'on approche de la quantité nécessaire de Fe^{+++}. Cette réaction permet un dosage, en opérant en présence de sulfocyanure, mais l'apparition de la teinte rose de sulfocyanure ferrique qui marque la fin du dosage est difficile à observer à cause de l'intense couleur jaune qu'a prise la solution auparavant. Cette coloration est probablement due à la formation d'un complexe ferreux analogue à celui que donne l'acide tartrique.

En résumé, l'acide dihydroxymaléique réagit tantôt comme diénol, tantôt comme cétone selon le réactif utilisé, et nous avons pu mettre en évidence un équilibre céto-énol, avec environ 20 p. 100 de forme énol et 80 p. 100 de forme cétone.

Potentiel d'oxydo-réduction. — Nous avons déterminé le potentiel d'oxydo-réduction de l'acide dihydroxymaléique, en fonction du *p*H; nous avons utilisé des solutions N/1 000 et, comme oxydant, le dichlorophénolindophénol N/200. Les mesures ont été faites à 20°, à *p*H constants grâce à l'emploi de tampons citriques N/2. L'interprétation des courbes obtenues à chaque *p*H n'était pas aussi simple que d'habitude, du fait que nous avions la superposition de deux équilibres : équilibre acide dihydroxymaléique $\rightleftarrows$ acide dioxytartrique et équilibre entre les formes cétonique et diénolique de l'acide dihydroxymaléique, le potentiel d'équilibre était atteint lorsque nous avions des proportions égales d'acide dioxytartrique et d'acide dihydroxymaléique *sous forme diénolique*.

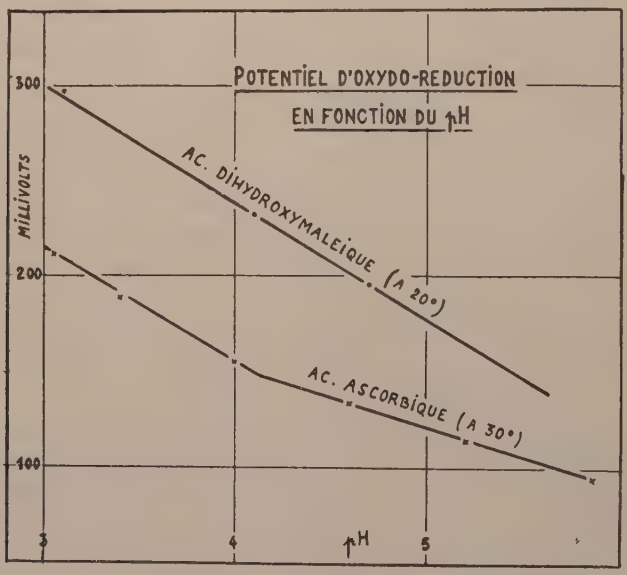


Fig. 3.

Nous avons fait 4 mesures, aux *p*H 3,1, 4,1, 4,7 et 5,5. Les valeurs du potentiel, rapportées à l'électrode d'hydrogène, ont été respectivement + 297, + 232, + 196 et + 142 mV. Comme l'indique la figure 3, ces 4 points se trouvent sur une droite ayant la pente classique de 60 mV par unité de *p*H, parallèle à celle que Ball (1937) a donnée pour l'acide ascorbique. Le *r*H correspondant est d'environ 16,5. La confrontation des deux droites de la figure 3 montre que l'acide ascorbique est nettement plus réducteur que l'acide dihydroxymaléique et sera capable de réduire l'acide dioxytartrique, ainsi que l'avaient déjà remarqué Genevois et Gay.

CHAPITRE II

ÉTUDE DES PRODUITS D'OXYDATION DE L'ACIDE DIHYDROXYMALÉIQUE

Nous avons vu que l'acide dihydroxymaléique est très sensible à l'oxydation et se décarboxyle aisément : ce dernier point sera repris plus loin. Pour l'instant, nous nous attacherons à mettre en évidence, qualitativement, les produits résultant de cette double réaction.

Acide dioxytartrique. — C'est, nous l'avons vu, le premier terme de l'oxydation de l'acide dihydroxymaléique. On l'obtient très aisément par action, sur cet acide, de l'iode, du dichlorophénolindophénol ou des sels ferriques; la réaction est d'ailleurs réversible et il est possible de revenir à l'acide dihydroxymaléique en réduisant l'acide dioxytartrique par la cystéine ou l'acide ascorbique.

Il est aisé de caractériser l'acide dioxytartrique par sa bisdinitrophénylhydrazone qui fond à 225° alors que la dinitrophénylhydrazone de l'acide dihydroxymaléique fond à 174° (L. Genevois et L. Gay). Par ailleurs l'acide dioxytartrique donne avec la *p*.sulfophénylhydrazine une intense coloration jaune; cette réaction, dite « de la tartrazine », sera étudiée en détail dans un chapitre suivant. Enfin, l'acide dioxytartrique donne une dioxime avec l'hydroxylamine, alors que l'acide dihydroxymaléique ne donne qu'une mono-oxime.

Si nous prenons une solution de tartrate ferreux préparée depuis un certain temps, deux mois par exemple, on constate qu'à côté de l'acide dihydroxymaléique reconnaissable à son pouvoir réducteur et de l'acide dioxytartrique, caractérisé ainsi que nous venons de le dire, il s'est formé plusieurs corps en C_3 et en C_2, dont nous avons identifié quelques-uns.

Acide glyoxylique. — Certaines réactions indiquent la présence d'acide glyoxylique; c'est ainsi que la solution, traitée par du pyrogallol à 1 p. 100 dans SO_4H_2 pur, donne une coloration bleue qui, d'après W. R. Fearon, est spécifique de l'acide glyoxylique, tous les autres aldéhydes donnent dans ces conditions une coloration rouge.

Si la solution est chauffée avec de la phénylhydrazine à 1 p. 100 puis additionnée de son volume de ClH pur + 10 gouttes de ferricyanure de potassium à 1 p. 100, on obtient une coloration rouge, indiquée par R. Fosse et A. Hieulle, mais qui n'est pas spécifique de l'acide glyoxylique.

Beaucoup plus spécifique est la réaction d'Hopkins et Cole : si on met en contact sans les mélanger, une couche d'acide sulfurique pur et une couche de solution de tryptophane ayant reçu au préalable

quelques gouttes de la solution étudiée, on voit se développer à la limite des deux phases un anneau violet, cette réaction, utilisée pour caractériser le tryptophane, nous a servi au contraire à caractériser le réactif, encore qu'elle ne soit pas absolument spécifique.

Nous n'avons pu avoir la certitude de la présence de l'acide glyoxylique qu'en l'isolant à l'état de dinitrophénylhydrazone.

Nous avons isolé l'acide glyoxylique par entraînement à la vapeur d'eau; en faisant passer un volume de vapeur égal à 10 fois celui du liquide traité, on entraîne, d'après A. Pons (1949), 80 p. 100 de l'acide glyoxylique. Le distillat fut ensuite précipité, en milieu neutre, par le sous-acétate de plomb. Le glyoxylate de plomb fut centrifugé, lavé, redissous dans l'acide sulfurique, le sulfate de plomb fut séparé et dans le liquide clair, l'acide glyoxylique a été précipité par la dinitrophénylhydrazine, en milieu chlorhydrique 2N, selon la technique préconisée par L. Genevois, que nous exposerons en détail à propos de l'étude des vins; au bout de 2 à 3 jours, le précipité fut lavé par HCl 2N, séché et recristallisé dans le mélange benzène-nitrobenzène; on trouva un point de fusion de 190°, correspondant précisément à celui qui est indiqué par Brady (1931).

Dès lors la présence d'acide glyoxylique était indiscutable et d'ailleurs elle avait été signalée par divers auteurs, en particulier par Benrath et Fenton.

Acide oxalique. — La caractérisation de l'acide oxalique à l'état de trace n'est pas aisée; nous fûmes servi par le hasard. Un échantillon d'acide dihydroxymaléique impur contenant des quantités notables de fer, fut mis en solution; au fur et à mesure de l'oxydation, d'ailleurs catalysée par le fer, nous avons observé un dépôt jaunâtre qui, à l'analyse, s'est révélé être de l'oxalate ferreux.

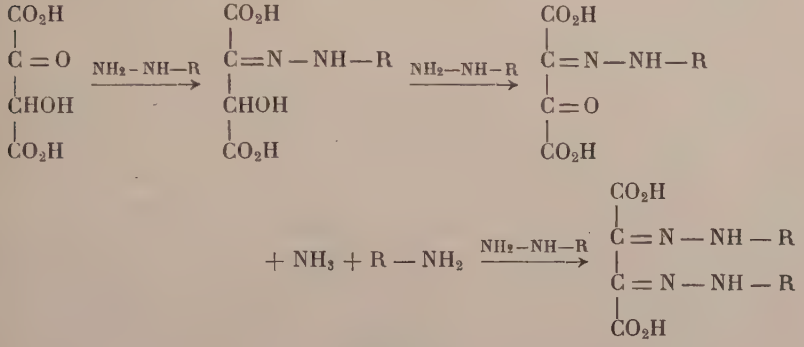
Par ailleurs, dans une solution de tartrate ferreux, nous avons pu précipiter des traces d'oxalate de calcium en milieu acétate d'ammonium.

Aldéhyde glycolique et glyoxal. — Ce sont les deux corps carbonyliques non acides susceptibles d'être produits et qui ont d'ailleurs été signalés par Fenton pour l'aldéhyde glycolique et Benrath pour le glyoxal. Neuberg et Schwenk signalent eux aussi la formation d'aldéhyde glycolique dans l'action de la carboxylase de la levure sur l'acide dihydroxymaléique, tandis que Schmalfuss et Barthmeyer l'obtiennent par chauffage à l'ébullition des solutions d'acide dihydroxymaléique. Pour les caractériser, nous avons tout d'abord débarrassé la solution de tous les autres corps en les précipitant par le sous-acétate de plomb en milieu neutre.

La précipitation par la 2.4.dinitrophénylhydrazine donne un magnifique précipité rouge orangé, mais ne peut être utilisée pour caractériser ces deux corps, car ils donnent la même bisdinitrophé-

nylhydrazone, fondant à 330°, le glyoxal directement, l'aldéhyde glycolique après oxydation de la fonction alcool selon un processus identique à celui qui est invoqué dans la formation des osazones (Pesez et Poirier), valable également pour l'acide dihydroxymaléique (formule 1).

Par contre, par la combinaison de deux réactions d'oxydation, il est possible de mettre ces deux corps en évidence : 100 cm³ de solution déféqués au sous-acétate de plomb, sont repris par SO_4H_2 pour précipiter l'excès de plomb ; on centrifuge et on neutralise au bicarbonate ; on ajoute ensuite 10 cm³ CO_3Na_2N et 50 cm³ d'iode N/100.



Formule 1.

On attend 1 heure et on titre par $S_2O_3Na_2$ N/100 l'iode en excès ; on détermine de la sorte la quantité d'iode consommée, donc la concentration en groupes carbonyles. Sur 100 cm³ de la même solution, également déféquée, on oxyde non plus par l'iode mais par le bichromate M/10 selon la technique préconisée par Nicloux pour le dosage de l'alcool ; on dose de la sorte non seulement les fonctions aldéhydes mais également les fonctions alcool primaire.

Nous avons fait ces dosages sur une solution de tartrate ferreux très anciennement préparée (6 mois environ) et nous avons trouvé :

— dosage par l'iode : X = 16,4 cm³ iode N/100 consommés par 100 cm³ sol. ;

— dosage par $Cr_2O_7K_2$: Y = 7,16 cm³ $Cr_2O_7K_2$ M/10 consommés par 100 cm³ sol. ;

soit 71,6 cm $Cr_2O_7K_2$ M/100.

D'après les équations :

(1) $CHO.CHO + 4I + 2H_2O \rightarrow CO_2H - CO_2H + 4IH.$

(2) $CH_2OH - CHO + 2I + H_2O \rightarrow CH_2OH - CO_2H + 2IH.$

(3) $3CHO - CHO + 2Cr_2O_7K_2 + 8SO_4H_2 \rightarrow 3CO_2H - CO_2H + 2(SO_4)_3Cr_2 + 2SO_4K_2 + 8H_2O.$

(4) $CH_2OH - CHO + Cr_2O_7K_2 + 4SO_4H_2 \rightarrow CO_2H - CO_2H + (SO_4)_3Cr_2 + SO_4K_2 + 5H_2O.$

On voit que x correspond à $\frac{10A}{4}$ micromolécules de CHO — CHO $+ \frac{10B}{2}$ micromolécules de CH_2OH — CHO et que y correspond à $\frac{30A}{3}$ micromolécules de CHO — CHO + 10B micromolécules de CH_2OH — CHO, d'où : A = 3,88 et B = 1,34.

Comme nous sommes parti de 100 cm³, la solution initiale contenait donc 38,8 micromolécules de CHO — CHO et 13,4 micromolécules de CH_2OH — CHO/litre.

Acide glycolique. — C'est le seul corps en C_2 prévisible que nous n'ayons pu mettre en évidence, faute de réactions d'identification un peu spécifiques. Sa présence néanmoins ne peut faire de doute : il est le produit normal de l'oxydation de l'aldéhyde glycolique ; il peut aussi être donné par réduction de l'acide glyoxylique et par dismutation du glyoxal :

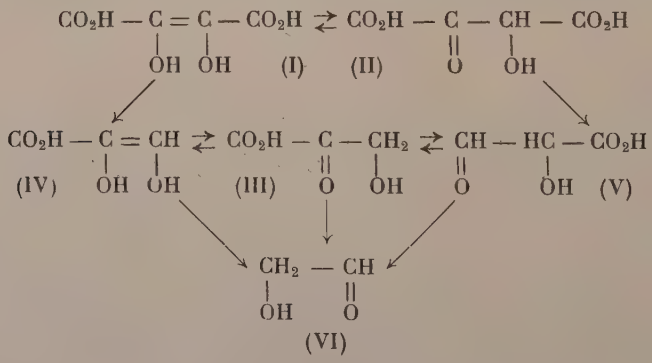
$$CHO - CHO + H_2O \rightarrow CH_2OH - CO_2H.$$

CHAPITRE III

DÉCARBOXYLATION DE L'ACIDE DIHYDROXYMALÉIQUE

Etude quantitative.

L'étude de l'oxydation de l'acide dihydroxymaléique nous a permis de mettre en évidence toute une série de corps. Pour pouvoir saisir mieux ce phénomène, qui est la résultante de deux décarboxylations



Formule 2.

et d'oxydations successives, nous avons étudié l'évolution de solutions d'acide dihydroxymaléique à l'abri de l'air, cette étude devant permettre d'envisager les réactions de décarboxylation seules. Dans ces conditions, l'acide dihydroxymaléique qu'il soit sous forme énolique (I) ou cétonique (II) donne, par une première décarboxylation, l'acide hydroxypyruvique (III) ainsi que ses deux formes tautomères : l'acide réductonique (IV) et le propanolaloïque (V) (Sivohnen, Gosh et Muckherjee). Après une deuxième décarboxylation, ces trois corps en C_3 conduisent à l'aldéhyde glycolique (VI).

Préparation de la solution. — De l'eau distillée est désoxygénée par ébullition, puis refroidie sous vide. Dans 1 litre de cette eau, en opérant toujours sous vide, on introduit 740 mg d'acide dihydroxymaléique ; ceci constitue donc une solution à 5 millimolécules par litre, soit N/100 en hydrogènes réducteurs et en ions H^+ ; cette solution est ensuite répartie, sous CO_2, en 10 flacons de 100 cm³ à bouchons paraffinés, ou bien conservée en stock d'où sont faits les prélèvements quotidiens sous CO_2 ; les deux techniques ont donné des résultats satisfaisants.

La solution est à pH = 2,7. La température est de 22°-23°.

Techniques utilisées. — Chaque jour nous avons fait une série de dosages sur cette solution afin de connaître les proportions relatives des divers produits d'évolution en fonction du temps.

Dosage à l'iode : 25 cm³ de solution sont additionnés de 50 cm³ d'iode N/100. Le mélange qui est à pH = 2,0 environ, est abandonné pendant une heure, l'expérience montrant que dans ces conditions la réaction est terminée et qu'au delà de ce temps il se fait des réactions parasites. On titre ensuite l'excès d'iode par l'hyposulfite N/100.

On dose ainsi :

la totalité d'acide dihydroxymaléique (sous forme énol),
la totalité des corps en C_3 sous forme d'acide réductonique,
soit au total N m.éq/litre.

Dosage de l'acidité : Après avoir dégazéifié sous vide pour chasser le CO_2 dégagé, on titre directement, sur 25 cm³ par NaOH N/50 en présence de bromothymol bleu soit M m.éq/litre.

Des deux chiffres N et M ainsi obtenus on tire :

a) pour la consommation d'iode :

$$\Sigma C_4 = 2x \text{ m.éq/litre}$$
$$\Sigma C_3 = 2y \text{ m.éq/litre ;}$$

b) pour les ions H^+ :

$$\Sigma C_4 = 2x \text{ m.éq/litre}$$
$$\Sigma C_3 = 2y \text{ m.éq/litre ;}$$

et nous avons :

$$2x + 2y = N$$

$$2x + y = M$$

d'où x m.mol en C_4 par litre $= M - \frac{N}{2}$ et y m.mol en C_3 par litre $= N - M$.

Dosage de $CH_2OH - CHO$: Sur 25 cm³ de solution, on précipite tous les corps acides (c'est-à-dire tous les corps en C_4 et C_3) par le sous-acétate de plomb en milieu neutre. On centrifuge, précipite l'excès de plomb par SO_4H_2, centrifuge de nouveau ; on passe alors

Tableau II

Temps d'évolution de la solution (en jours)	milliéquivalents par litre			millimolécules par litre			
	iode en milieu acide N	ions H^+ M	iode après ppt par Pb N_1	x corps en C_4	y corps en C_3	z corps en C_2	Total
1	8,4	5,6	1,6	1,4	2,8	0,8	5,0
2	6,9	3,9	3,3	0,45	3,0	1,65	5,1
3	5,9	3,15	4,0	0,12	2,75	2,0	4,95
4	4,6	2,4	5,6	0,1	2,2	2,6	4,9
5	3,8	1,9	6,2	0,0	1,9	3,1	5,0
7	2,4	1,2	7,4	0,0	1,2	3,7	4,9
8	1,8	0,9	8,2	0,0	0,9	4,1	5,0
9	1,0	0,5	8,8	0,0	0,5	4,4	4,9
10	1,0	0,5	9,0	0,0	0,5	4,5	5,0

en milieu légèrement alcalin par une solution N de CO_3Na_2, on ajoute un excès d'iode N/100 (50 cm³), on laisse réagir 1 heure et on titre l'excès d'iode par $S_2O_3Na_2$ N/100 (Méthode de Bougault). Soit N_1 m.éq./litre. Comme il faut 2 iodes par molécule d'aldéhyde, on a finalement : $CH_2OH - CHO = z$ m.mol/litre $= \frac{N_1}{2}$ m.mol/litre.

Mesures : Nous avons suivi l'évolution d'une telle solution pendant 10 jours (tableau II).

D'après ces chiffres et surtout les courbes que l'on peut en tirer (cf. fig. 4), on constate tout d'abord que l'acide dihydroxymaléique se décarboxyle très vite. Cette décarboxylation se fait en deux temps, ce qui permet une relative accumulation de corps en C_3 pendant les deux premiers jours. Ces corps en C_3 se décarboxylent à leur tour, la deuxième décarboxylation étant beaucoup plus lente que la première, puisqu'on peut calculer les « périodes » (temps de décomposition de

la moitié du corps mis en réaction), que l'on trouve égales à 12 heures pour l'acide dihydroxymaléique et à 84 heures pour les corps en C_3, ce qui indique que la première décarboxylation est 7 fois plus rapide que la seconde.

Finalement, et en une dizaine de jours, la réaction conduit à l'accumulation d'aldéhyde glycolique.

En résumé, l'acide dihydroxymaléique se décarboxyle spontanément en solution aqueuse, à l'abri de toute oxydation. Par l'intermédiaire de corps en C_3, cette réaction conduit à l'aldéhyde glycolique, la deuxième réaction de décarboxylation étant environ 7 fois plus lente que la première.

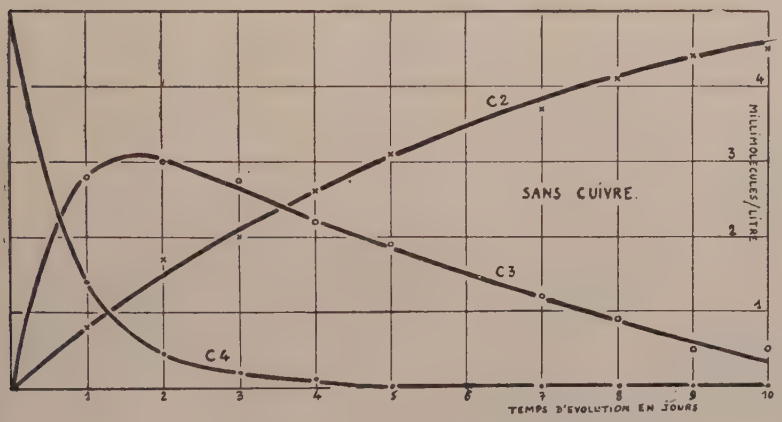


Fig. 4.

Influence du cuivre.

On connaît le rôle catalytique du cuivre dans maintes oxydations, notamment celles de l'acide ascorbique, de l'acide tartrique. Nous avons voulu voir si le cuivre pouvait également jouer le rôle de catalyseur dans la décarboxylation de l'acide dihydroxymaléique.

A cet effet nous avons préparé trois solutions, dans les conditions précédemment exposées, mais recevant en outre 0,5, 2 et 4 mg de cuivre sous forme de sulfate. Nous avons refait alors les expériences quotidiennes que nous avons déjà relatées, et dont nous groupons les résultats dans le tableau ci-après, où nous avons intentionnellement confondu les deux solutions à 2 et 4 mg de cuivre, qui nous ont donné des résultats identiques (tableau III).

Si nous comparons les courbes tracées avec ces chiffres (cf. fig. 5)

et celles de l'expérience sans cuivre (fig. 4) nous voyons immédiatement l'effet catalytique du métal : avec 0,5 mg de cuivre par litre, la vitesse de décarboxylation de l'acide dihydroxymaléique est doublée

TABLEAU III

Temps d'évolution des solutions en heures		Milliéquivalents par litre			millimolécules par litre			
		iode en milieu acide (N)	ions H+ (M)	iode après pp. par Pb	corps en C_4 (x)	Corps en C_3 (y)	corps en C_2 (z)	total
3 H	0,5 mg Cu	8,8	8,10	1,2	3,60	0,80	0,60	5,00
	2-4 "	-	-	-	-	-	-	-
6 H	0,5 "	7,7	6,35	2,2	2,5	1,35	1,10	4,95
	2-4 "	6,1	4,85	3,8	1,8	1,25	1,9	4,95
24 H	0,5 "	3,5	2,4	6,5	0,65	1,1	3,25	5,00
	2-4 "	1,85	1,2	8,4	0,3	0,6	4,2	5,10
48 H	0,5 "	1,4	0,9	8,8	0,2	0,5	4,4	5,10
	2-4 "	0,7	0,35	9,6	0,0	0,35	4,8	5,15
72 H	0,5 "	0,4	0,2	9,5	0,0	0,2	4,75	4,95
	2-4 "	0,7	0,15	9,6	0,0	0,15	4,8	4,95
96 H	0,5 "	0,2	0,1	9,8	0,0	0,1	4,9	5,00
	2-4 "	0,15	0,0	9,8	0,0	0,0	4,9	4,90
120 H	0,5 "	0,0	0,0	9,8	0,0	0,0	4,9	4,90
	2-4 "	-	-	-	-	-	-	-

puisque la moitié du corps a disparu en 6 heures au lieu de 12 heures ; d'après la pente de la courbe C_3, la deuxième décarboxylation est sensiblement accélérée, mais nous constatons qu'il se forme moins de corps en C_3, dans les premières heures. Les mêmes phénomènes se retrouvent, encore amplifiés, avec la solution contenant 2 mg de cui-

vre : la moitié du corps en C_4 est décarboxylée en un peu plus de 3 heures, mais il se forme très peu de corps en C_3 ; l'acide dihydroxymaléique, en présence de traces de cuivre, se décompose donc plus vite et ceci par double décarboxylation directe.

Cette catalyse est particulièrement importante, car elle est provoquée par des doses de cuivre qui sont à l'échelle biologique et que l'on retrouve dans le sang et dans les vins, par exemple.

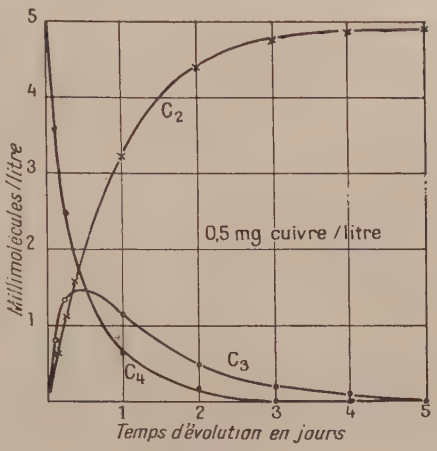


Fig. 5.

DEUXIÈME PARTIE

L'ACIDE DIOXYTARTRIQUE

Le premier terme de l'oxydation de l'acide dihydroxymaléique est l'acide dioxytartrique $CO_2H — CO — CO — CO_2H$. Ce dernier est lui aussi très sensible à la décarboxylation et à l'oxydation et l'étude de cette décomposition va nous permettre de mettre en évidence de nouveaux corps.

CHAPITRE PREMIER

ÉTUDE DE LA DÉCARBOXYLATION

Nous avons tout d'abord étudié la décomposition de l'acide dioxytartrique, en solution aqueuse, sous vide, ceci nous permettant de mettre en évidence la décarboxylation seule. *A priori*, on peut prévoir que par perte du premier carboxyle, l'acide dioxytartrique conduit tout d'abord à l'acide glyoxylcarbonique (Fenton et Ryffel, Benrath) $CO_2H — CO — CHO$ et qu'après départ du deuxième caboxyle on aboutit finalement au glyoxal CHO — CHO.

Nous avons opéré sur une solution à 740 mg par litre, soit M/200 (5 millimolécules par litre) c'est-à-dire N/100 en ions H^+ et en carboxyles. Cette solution a été préparée sous vide avec de l'eau désoxygénée et conservée sous vide. Le *p*H était de 2,7 et la température de 22°.

Techniques utilisées. — Chaque jour, les dosages suivants ont été effectués :

a) *Dosage des carboxyles :* Après avoir chassé sous vide le CO_2 dégagé, on titre directement, sur 25 cm³, par NaOH N/50 en présence de bromothymol bleu. Soit M milliéquivalents par litre ; on dose ainsi l'acide dioxytartrique (C_4), 2 milliéquivalents par millimolécule, et l'acide glyoxylcarbonique (C_3), 1 milliéquivalent par millimolécule.

b) *Dosage des carbonyles totaux :* On utilise la technique à l'hydroxylamine précédemment décrite; à 25 cm³ de solution ajustée à *p*H = 4 on ajoute 10 cm³ NH_2OH, HCl N/10 ajustée à *p*H = 4, on laisse réagir 20 min et on dose HCl libéré par NaOH N/50, en ramenant le *p*H à sa valeur initiale de 4,0. Soit K milliéquivalents par litre. On dose ainsi l'acide dioxytartrique (C_4), l'acide glyoxylcarbonique (C_3) et le glyoxal (C_2), ces trois corps à raison de 2 milliéquivalents par millimolécule.

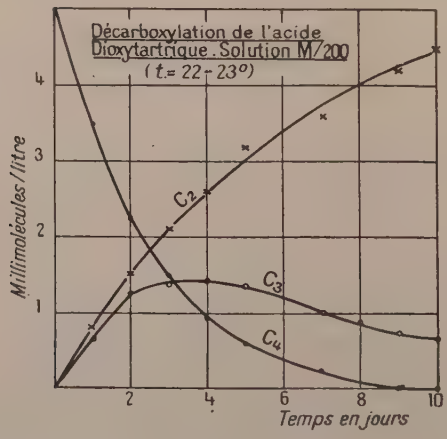


Fig. 6.

c) *Dosage des carbonyles après défécation :* 25 cm³ de solution sont déféqués à *p*H = 7 par 5 cm³ de sous-acétate de plomb, on centrifuge. On précipite l'excès de plomb par SO_4H_2, on centrifuge, on ajuste à *p*H = 4 et on dose les carbonyles. Soit N milliéquivalents

par litre, représentant uniquement le glyoxal (C_2) à raison de 2 milliéquivalents par millimolécule.

On a donc finalement :

$$\text{Glyoxal } (C_2) = \frac{N}{2} \text{ m.mol/litre.}$$

$$\text{Acide glyoxylcarbonique } (C_3) = K - (M + N) \text{ m.mol/litre.}$$

$$\text{Acide dioxytartrique } (C_4) = \frac{2M + N - K}{2} \text{ m.mol/litre.}$$

Résultats analytiques. — Ces dosages quotidiens nous ont donné les résultats suivants (cf. tableau IV). Pour les carbonyles totaux, ainsi qu'il fallait s'y attendre, on trouve un chiffre constant puisqu'il n'y a pas de perte de carbonyles ; ces dosages n'ont été faits que pour montrer qu'il n'y a pas eu d'oxydation au cours des expériences.

De ces chiffres et des courbes qui en ont été déduites (cf. fig. 6), on vérifie qu'en l'absence d'oxygène, l'acide dioxytartrique se décarboxyle en acide glyoxylcarbonique, puis en glyoxal, tout comme se décar-

Tableau IV

Temps d'évolution de la solution, en jours. -	milliéquivalents par litre			millimolécules par litre		
	ions H^+ (M)	carbonyles totaux (K)	carbonyles après défécation au plomb. (N)	ac.dio. xytar- trique C4	ac.gly- oxyl- carbo- nique C3	Glyoxal C2
1	7,65	9,9	1,6	3,5	0,65	0,8
2	5,75	10,0	3,0	2,25	1,25	1,5
3	4,35	9,9	4,2	1,50	1,35	2,1
4	3,3	9,9	5,2	0,95	1,4	2,6
5	2,55	10,3	6,4	0,6	1,35	3,2
7	1,5	9,7	7,2	0,25	1,0	3,6
8	1,4	10,3	8,0	0,25	0,9	4,0
9	0,75	9,9	8,4	0,0	0,75	4,2
10	0,65	10,3	9,0	0,0	0,65	4,5

boxyle l'acide dihydroxymaléique en divers corps en C_3 et en aldéhyde glycolique, mais avec des vitesses moindres. Le temps de demi-réaction, pour la première décarboxylation, qui était de 12 heures pour l'acide dihydroxymaléique, est ici supérieur à 40 heures; pour la deuxième décarboxylation, ce temps est de 150 heures environ au lieu de 84, sensiblement le double. C'est ce qu'avaient déjà indiqué Wieland et Franke.

CHAPITRE II

ÉTUDE DE L'OXYDATION

Afin de mettre plus aisément en évidence les corps produits par l'oxydation de l'acide dioxytartrique, nous avons étudié un échantillon de cet acide qui avait été conservé pendant près de 3 ans en glacière.

Etude qualitative. — Le produit, devenu déliquescent, ne donne pratiquement plus la réaction de la tartrazine ; on peut donc assurer *a priori* qu'il ne contient plus ni acide dioxytartrique ni acide glyoxylcarbonique qui, lui aussi, avec son carboxyle et ses deux carbonyles donnerait une intense réaction de la tartrazine.

En milieu acétate d'ammonium, la solution du produit donne un précipité avec le chlorure de calcium ; ce précipité, redissous dans un acide fort, réduit le permanganate mais ne donne pas de précipité avec la dinitrophénylhydrazine ; il ne peut donc s'agir que d'acide oxalique.

La solution initiale, par contre, précipite avec la dinitrophénylhydrazine, preuve de l'existence d'une ou plusieurs fonctions carbonyle.

Après précipitation par le sous-acétate de plomb, la solution ne donne plus de dinitrophénylhydrazone ; il en est de même du produit d'entraînement à la vapeur en milieu faiblement alcalin (pH $= 8{,}2$) ; le produit ne contient donc pas de glyoxal.

Si l'entraînement à la vapeur a lieu en milieu acide, le distillat donne un précipité de dinitrophénylhydrazone ; il ne peut s'agir que d'acide glyoxylique, mais il est aisé de montrer que cet acide est formé au cours de la distillation. En effet le produit initial ne précipite pas par le dimédon, ce qui montre l'absence de groupe aldéhydique ; par ailleurs, tous les carboxyles sont précipitables par le baryum, alors que le glyoxylate de baryum n'est insoluble qu'en milieu alcoolique. Enfin si on chauffe le produit en milieu chlorhydrique en présence de naphtorésorcine (réaction de Tollens), on n'obtient aucune coloration, alors qu'une trace d'acide glyoxylique aurait donné une intense coloration rouge (Bergmann et Wolff).

Si on précipite le produit par la dinitrophénylhydrazine, on obtient un produit fondant à 200°, très soluble dans l'eau bicarbonatée ; or la dinitrophénylhydrazone de l'acide mésoxalique fond à 202°. Nous avons aussi préparé la phénylhydrazone fondant à 172°-173° ce qui correspond aussi à l'acide mésoxalique (Chattaway et Harris).

Il est hors de doute que nous nous trouvons en présence d'un mélange d'acide mésoxalique $CO_2H-CO-CO_2H$ et d'acide oxalique CO_2H-CO_2H, ainsi que l'avaient déjà vu Wieland et Franke. Ceci montre que l'oxydation de l'acide glyoxylcarbonique est plus rapide que sa décarboxylation. On peut en déduire aussi que la vitesse d'oxydation de l'acide glyoxylique est supérieure à celle de la décarboxylation de l'acide mésoxalique. Nous avons donc la chaîne de réactions suivante :

$$CO_2H-CO-CO-CO_2H \rightarrow [CO_2H-CO-CHO+CO_2]$$
$$\xrightarrow{+O} CO_2H-CO-CO_2H \rightarrow [CO_2H-CHO+CO_2] \xrightarrow{+O} CO_2H-CO_2H.$$

Etude quantitative. — a) *Dosage de l'eau :* 1,065 g de produit est séché sous vide à 65°. On pèse 0,745 g de produit sec. Il y a donc 30 p. 100 d'eau.

b) *Dosage des carbonyles :* On dose par l'hydroxylamine, sur 25 cm³ de solution à 10 g par litre; il faut 5,5 cm³ NaOH N/10, ce qui fait 22 m.éq de carbonyles par litre de solution.

c) *Acidité totale :* 100 cm³ de la solution précédente sont dosés par NaOH N/2 : il en faut 27,5 cm³, ce qui représente 137,5 m.éq ions H^+/litre.

d) *Dosage de l'acide oxalique :* 50 cm³ de la solution sont précipités par le chlorure de calcium en milieu acétate d'ammonium ; on glace pendant 4 heures, lave le précipité, sèche et pèse ; on trouve 305 mg. Or 1 m.éq d'oxalate de calcium équivaut à 64 mg. On a donc 4,75 m.éq dans la prise et 95 m.éq/litre. Par ailleurs, le précipité, redissous dans l'acide sulfurique est titré par MnO_4K N/10 ; on trouve là aussi 95 m.éq d'acide oxalique/litre.

e) *Acide mésoxalique :* il reste donc 42,5 m.éq ions H^+ pour l'acide mésoxalique. Comme on a dosé par ailleurs 22,0 m.éq de carbonyle et qu'il y a 2 H^+ pour un carbonyle, ces deux chiffres coïncident à 3 p. 100.

En résumé, pour 100 g de produit brut, nous avons : 30,0 g d'eau ; 42,75 g d'acide oxalique ; 25,96 g d'acide mésoxalique ; total 98,71 g. L'indosé est donc de 1,3 p. 100.

Conclusions. — L'étude de la décarboxylation de l'acide dioxytartrique nous a permis de mettre en évidence l'acide glyoxylcarbonique et le glyoxal. En présence d'oxygène il se produit de l'acide mésoxalique et de l'acide oxalique, ainsi que l'avaient déjà montré Wieland

et Franke avec, comme produits intermédiaires, l'acide glyoxylcarbonique, et l'acide glyoxylique que nous avons mis en évidence au sujet de l'oxydation de l'acide dihydroxymaléique.

Quant à l'acide tartronique, $CO_2H - CHOH - CO_2H$, que Lachman indique comme produit dérivé de l'acide dioxytartrique, nous ne l'avons pas identifié. D'ailleurs, il faudrait pour admettre cette hypothèse, invoquer le passage à l'acide glyoxylcarbonique, puis oxydation en acide mésoxalique, puis réduction en acide tartronique ; cette oxydation, suivie d'une réduction, implique des conditions d'évolution assez spéciales, mais qu'évidemment il serait possible de trouver dans des milieux tel que le vin qui est précisément soumis, au cours de son élaboration à des oxydations et des réductions successives. Par contre, l'acide tartronique pourrait se produire très facilement à partir de l'acide dihydroxymaléique, décarboxylé en propanolaloïque, puis oxydé :

$$CO_2H - \underset{\underset{O}{\|}}{C} - \underset{\underset{OH}{|}}{CH} - CO_2H \xrightarrow{-CO_2} CO_2H - \underset{\underset{OH}{|}}{CH} - \underset{\underset{O}{\|}}{CH} \xrightarrow{+O} CO_2H - \underset{\underset{OH}{|}}{CH} - CO_2H.$$

C'est d'ailleurs ce qu'ont observé Schmalfuss et Barthmayer en chauffant à 70° le dihydroxymaléate de mercure. Mais comme pour l'acide glycolique, dont la présence est certaine, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence ces deux acides-alcools d'une façon probante.

Nous avons vu précédemment que l'acide dioxytartrique est très sensible à l'oxydation et se décarboxyle rapidement en acide mésoxalique puis oxalique.

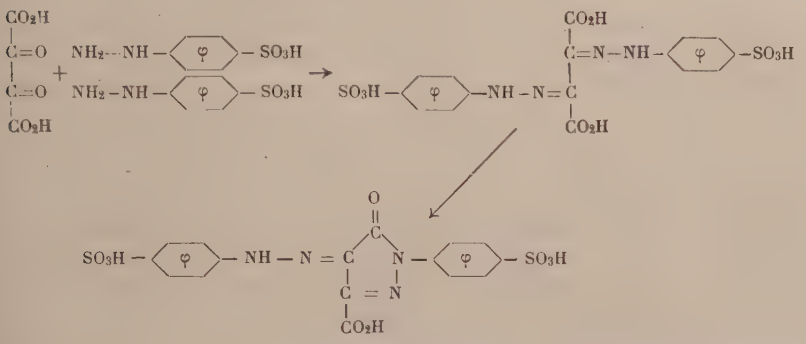
Nous allons maintenant étudier cette instabilité plus en détail, en fonction non seulement du temps, mais aussi du *p*H et des catalyseurs tels que le cuivre et le fer. Pour cela nous nous sommes servi d'une réaction dont nous avons déjà parlé et que nous allons tout d'abord étudier plus particulièrement : la réaction de la tartrazine.

CHAPITRE III

LA RÉACTION DITE « DE LA TARTRAZINE »

C'est en 1887 que Ziegler et Lacher ont pour la première fois décrit la condensation de l'acide dioxytartrique avec la para-sulfophénylhydrazine ; cette réaction aboutit à la formation d'un dérivé monosubstitué à froid, disubstitué à chaud ; ce dernier se sépare sous forme d'une poudre orangée soluble dans l'eau, à laquelle Ziegler et Lacher donnèrent le nom de « Tartrazine » : deux molécules de *p*-sulfophé-

nylhydrazine s'unissent à une molécule d'acide dioxytartrique pour donner une bis-*p*-sulfophénylhydrazone qui serait susceptible de se cycliser pour donner la tartrazine :



Formule 3.

Ziegler et Lacher opéraient sur des solutions très concentrées, ce qui explique la précipitation du colorant formé ; mais si on opère sur des solutions de concentrations susceptibles de se rencontrer dans les milieux biologiques, c'est-à-dire au maximum N/100 en acide dioxytartrique, le colorant jaune formé est parfaitement soluble et peut prêter à un dosage colorimétrique de l'acide dioxytartrique. Cette réaction a été à maintes reprises utilisée pour caractériser l'acide dioxytartrique, notamment par Genevois et Mlle Gatet, mais jamais à des fins quantitatives. Ces auteurs ont signalé qu'elle n'était pas spécifique, et qu'elle était donnée par « les corps α-dicétoniques, en particulier les acides déhydro-ascorbique, glyoxylcarbonique, la réductone... ».

Nous avons donc entrepris l'étude systématique et quantitative de cette réaction, afin d'essayer d'en dégager une méthode de dosage de l'acide dioxytartrique et des autres corps donnant cette réaction.

Conditions expérimentales. — Dans toutes nos expériences nous allons utiliser comme réactif une solution aqueuse fraîchement préparée de *p*-sulfophénylhydrazine à 5 g par litre. Cette solution ne se conserve pas ; légèrement jaune au moment de sa préparation, elle ne tarde pas à prendre une coloration plus intense et au bout de 24 heures elle est devenue d'un rouge-orangé foncé. Il faut donc utiliser un réactif préparé au moment de l'emploi et avoir soin, dans toutes les lectures d'absorption à l'électrophotomètre, de faire un essai-témoin avec le réactif seul pour en déterminer l'absorption propre. Nous avons toujours utilisé un volume de ce réactif tel que nous en ayons un gros excès par rapport à la quantité théorique, après

avoir vérifié qu'il importait seulement d'en avoir un excès, quel qu'il soit.

La réaction de la tartrazine donne une coloration jaune ; on en mesure l'intensité par son absorption, grâce à l'électrophotomètre de Meunier, modifié sur les plans de M. Genevois pour être directement éclairé en lumière monochromatique : la source lumineuse est constituée par une lampe à vapeurs de mercure ; un écran bleu ne laisse passer que la raie $\lambda = 436$ mμ du mercure ; le flux monochromatique vient alors frapper l'arête d'un prisme qui le partage en deux flux égaux, chacun allant exciter une des cellules photoélectriques de l'appareil. Les cuves utilisées, en quartz, ont une épaisseur de 1 cm.

Nous exprimerons toujours les absorptions en divisions du tambour de l'électrophotomètre, pour la longueur d'onde $\lambda = 436$ mμ.

Dans une cuve de l'électrophotomètre nous introduisons 5 cm³ d'une solution environ N/1 000 d'acide dioxytartrique et 1 cm³ de réactif ; dans la cuve-témoin, 5 cm³ d'eau et 1 cm³ de réactif ; pendant toute la durée de l'expérience, l'appareil est réglé sur cette cuve-témoin ; dans la cuve de réaction, on voit se développer une belle coloration jaune et on mesure l'absorption de 10 en 10 min (tableau V).

Tableau V

Temps de réaction en minutes	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150
Absorptions	200	227	249	260	276	284	293	299	305	309	315	321	323	327	331

La courbe bien régulière ainsi obtenue indique que la réaction n'est pas terminée au bout de 2 heures et demie, ce qui n'est guère commode pour un dosage.

Nous avons fait alors la réaction au bain-marie bouillant.

Influence du temps de chauffage. — Dans des tubes à essais gradués à 20 cm³, nous avons mis 2 cm³ de solution à 100 mg d'acide dioxytartrique par litre + 3 cm³ d'eau + 2 cm³ de réactif ; tous les tubes sont immergés dans un bain-marie bouillant ; au bout d'un temps donné, on sort un tube ; on le refroidit rapidement, on complète le volume à 20 cm³ et on mesure l'absorption du colorant formé. On peut ainsi construire une courbe (cf. fig. 7) qui présente un palier maximum entre 7 et 20 min de chauffage. D'autres essais, comme le

suivant, nous ont montré qu'au delà de 20 min, l'intensité du colorant formé tend à décroître très lentement (tableau VI).

Cette chute d'intensité est d'ailleurs très faible puisque après 1 heure de chauffage elle n'est que de 4 p. 100 par rapport au maximum.

Tableau VI

Temps de chauffage en minutes	2	4	6	8	10	12	15	17	20	30	45	60
Absorptions.	153	215	231	237	239	240	236	238	238	229	226	224

Dans toutes les expériences suivantes nous avons choisi une durée de chauffage de 15 min, ce qui est très près de l'optimum.

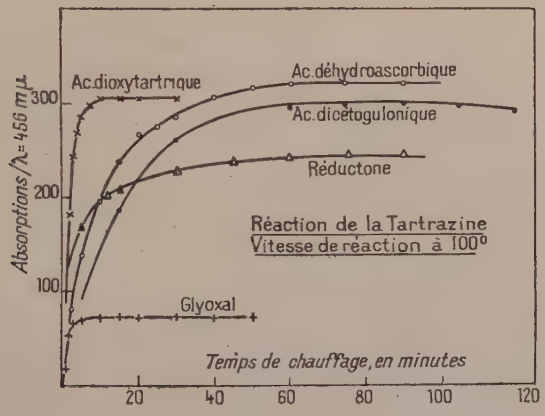


Fig. 7.

Influence du *p*H de réaction. — Au cours de nos essais, nous avons été amené à envisager la question du *p*H auquel est faite la réaction, ce qui semblait avoir une très grosse importance, et à déterminer pour quelle valeur de *p*H la réaction est maximum. Pour cela, nous avons mis dans des tubes à essais 5 cm³ de solution d'acide dioxytartrique + 5 cm³ d'eau distillée + 2 cm³ de réactif, puis une certaine quantité de ClH ou de soude N/20 déterminée à l'avance au *p*H-mètre,

pour porter le milieu à des *p*H variant de 2,25 à 3,40, des essais préliminaires nous ayant montré que le *p*H optimum était compris entre 2,5 et 3,5. Tous les tubes sont immergés 15 min dans le bain-marie bouillant, puis refroidis, complétés à 20 cm³ et l'on fait les mesures d'absorption.

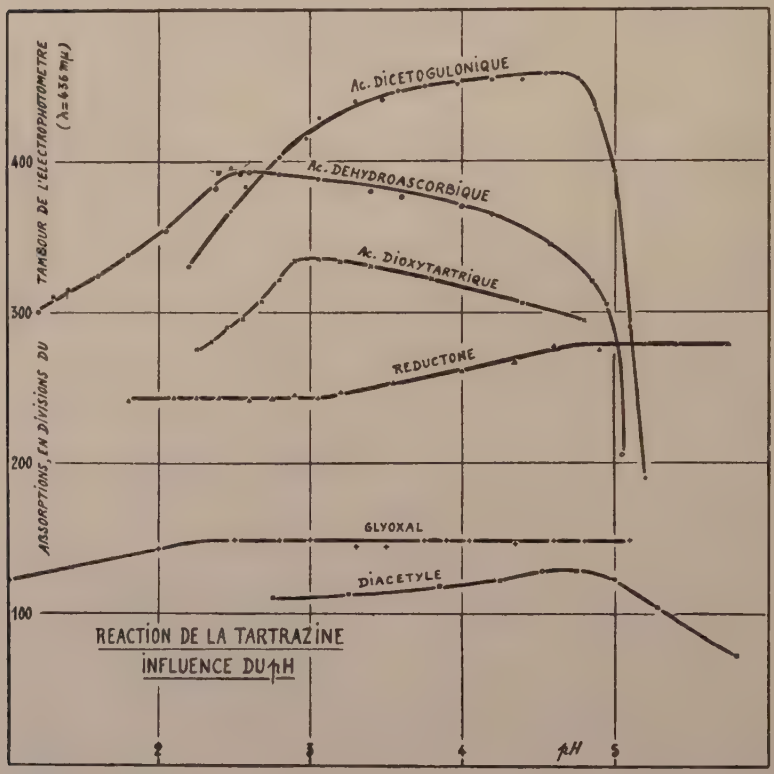


Fig. 8.

En portant en abscisses les *p*H de réaction et en ordonnées les mesures d'absorption, la courbe ainsi construite (cf. fig. 8) présente un maximum entre 2,9 et 3,2. C'est donc à $pH = 3{,}0$ que nous ferons les essais ultérieurs. Nous avons vérifié qu'à un *p*H défavorable ($pH = 2{,}5$ par exemple) l'amplitude de la réaction n'est pas modifiée

par un chauffage plus prolongé : un *p*H donné impose vraiment une limite à la réaction et cette limite est maximum à *p*H = 2,9-3,2.

Comportement de l'acide dioxytartrique, en fonction du temps et du *p*H vis-à-vis de la *p*-sulfophénylhydrazine. — Nous avons constaté qu'il était impossible, sur une solution, de retrouver la même amplitude de réaction à quelques minutes d'intervalle : telle solution qui donne une coloration dont l'absorption est de 3o5 13 min après sa préparation, voit cette absorption tomber à 237 si l'on fait la réaction au bout d'une heure, 191 si la réaction est faite au bout de 2 heures, etc., cela n'a rien de surprenant puisque nous savons que l'acide dioxytartrique en solution aqueuse, et surtout en présence d'O_2, est très instable; nous avons étudié l'influence du *p*H sur cette instabilité. Pour cela nous avons préparé 8 solutions d'acide dioxytartrique à 5o mg/litre, tamponnées à des *p*H variant de 1,2 à 6,85. Le temps

Tableau VII

*p*H de conservation des solutions	Absorptions mesurées après un temps de conservation de				
	1 h 20	1 h 5o	2 h 25	3 h	3 h 3o
1,2	153	125	114	120	84
2,1	187	162	157	148	142
2,7	245	220	190	182	162
3,2	202	170	134	125	107
3,8	160	120	82	70	52
4,25	113	77	42	35	19
4,7	100	57	22	—	10
6,85	45	10	9	8	—

étant compté à partir du moment où l'acide est versé dans le tampon, on prélève de temps en temps 5 cm³ de chaque solution, on ajoute 2 cm³ de réactif et la quantité de soude ou d'acide chlorhydrique N/20 préalablement calculée pour amener le *p*H à 3,0 dans tous les tubes; on porte alors au bain-marie pendant 15 min, puis on refroidit, complète à 20 cm³ et fait les mesures d'absorption (tableau VII).

Ce premier essai nous ayant montré que le maximum de stabilité des solutions était obtenu pour un *p*H compris entre 2,1 et 3,2 nous avons fait une deuxième expérience avec une échelle de *p*H plus serrée (tableau VIII).

Tableau VIII

*p*H de conservation des solutions	Absorptions mesurées après un temps de conservation des solutions égal à		
	1 h 30	2 h 15	4 h 30
2,4	264	233	162
2,5	271	238	163
2,6	276	243	160
2,7	266	231	139
2,8	264	227	141
2,9	259	215	127
3,0	254	205	122
3,1	246	199	107
3,2	236	193	97

D'après ce tableau le *p*H optimum de conservation des solutions est 2,6, mais même à ce *p*H, la stabilité de l'acide dioxytartrique est bien faible, comme le précise l'essai suivant : jusqu'à maintenant, la longueur des manipulations à effectuer sur 8 ou 9 solutions ne nous a pas permis de contrôler l'évolution de ces solutions avant 1 h 30. Nous avons maintenant préparé une solution au *p*H optimum = 2,6 de sorte que nous avons pu mettre le premier tube au bain-marie

Tableau IX

Age de la solution en minutes . .	3 1/2	17	32	45	60	75	90	105	120	135
Absorptions . .	312	294	271	264	250	230	215	201	196	191

3 min 1/2 après la mise en tampon de l'acide dioxytartrique (tableau IX). Donc même au *p*H optimum de stabilité, l'acide dioxytartrique est détruit pour 28 p. 100 en 1 heure, 38 p. 100 en 2 heures.

Nous avons ensuite repris la même expérience à pH = 4,7 qui est le pH optimum de réaction de l'acide dicétogulonique (tableau X) :

Tableau X

Age de la solution en minutes . .	14	40	55	70	87	100	115
Absorptions . .	294	204	161	138	100	80	64

l'acide dioxytartrique est évidemment détruit beaucoup plus vite : 50 p. 100 en 1 heure, 80 p. 100 en 2 heures (cf. fig. 9).

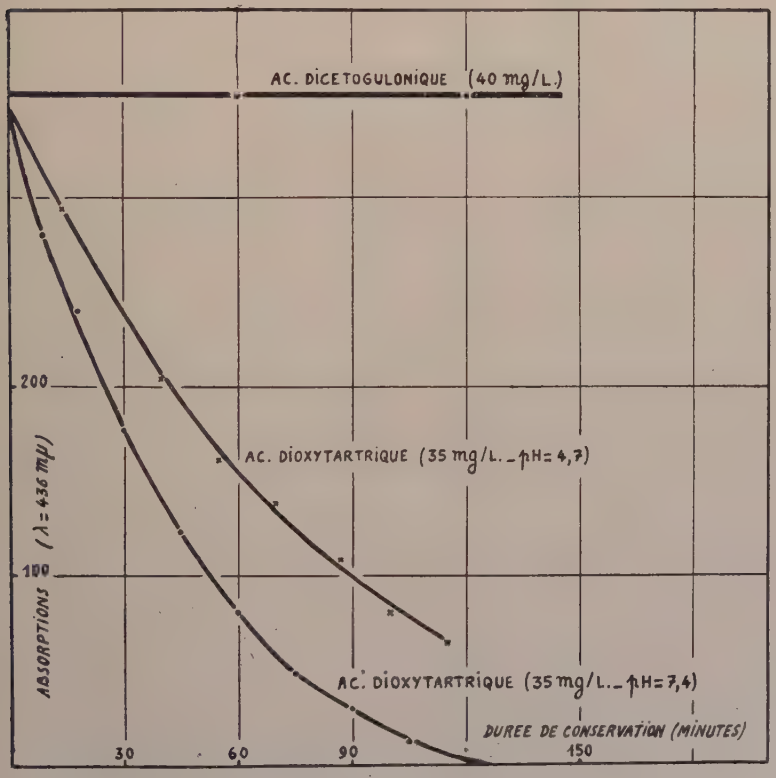


Fig. 9.

Cette destruction est encore beaucoup plus rapide à pH = 7,4 (cf. fig. 9), la réaction étant faite comme précédemment à pH = 4,7 (tableau XI).

Tableau XI

Age de la solution en minutes . .	9	18	30	45	60	75	90	105	120
Absorptions . .	280	240	177	123	80	48	30	12	8

Remarquons que l'extrapolation des deux courbes de la figure 6 conduit à la même ordonnée d'origine, ce qui est normal puisqu'il s'agit de deux solutions à 35 mg par litre environ.

Sur la même figure nous avons porté la courbe d'évolution d'une solution d'acide dicétogulonique à 40 mg/litre qui, elle, est bien stable. Ceci est très important pour doser côte à côte les acides dioxytartrique et dicétogulonique.

Courbe d'étalonnage de la réaction de la tartrazine. — Etant donnée l'instabilité de l'acide dioxytartrique, il s'avérait difficile d'obtenir une courbe d'étalonnage, puisqu'il aurait fallu pour cela pouvoir « saisir » plusieurs solutions de titres différents au temps zéro.

Aussi avons-nous dû établir, pour chaque solution de titre donné, une courbe de destruction en fonction du temps analogue à celles de la figure 9, extrapoler à l'origine des temps, et avec ces ordonnées d'origine construire une courbe des absorptions en fonction de la quantité d'acide dioxytartrique mis en réaction ; nous ne reproduirons pas le détail de ces opérations, longues et monotones, qui nous ont amené à la courbe représentée sur la figure 10 ; nous l'avons établie non pas au pH optimum de réaction (pH = 3,0), mais à pH = 4,7, qui est le pH de réaction optimum pour l'acide dicétogulonique, cette courbe nous ayant servi à doser côte à côte l'acide dioxytartrique et l'acide dicétogulonique. Pour la même raison nous avons utilisé un chauffage au bain-marie non pas de 15 mais de 75 min.

Nous avons obtenu une droite passant par l'origine (cf. fig. 10), ce qui montre que la réaction suit parfaitement la loi de Beer-Lambert, c'est-à-dire que les absorptions mesurées sont proportionnelles aux quantités d'acide dioxytartrique mis en réaction.

Il nous faut ajouter une remarque très importante : si, comme nous l'avons vu, une solution d'acide dioxytartrique se détruit spontanément à froid, il va sans dire qu'à chaud cette destruction est beaucoup plus rapide. Mais si ce chauffage est effectué en présence de p-sulfo-

phénylhydrazine, même au bout de 1 heure, la destruction est infime. Dans ces conditions il paraît évident qu'à froid la tartrazine formée sera parfaitement stable et ceci a une grosse importance, devant permettre d'opérer un grand nombre de dosages à la fois, puisque nous aurons toute latitude, une fois les tubes refroidis, pour mesurer les absorptions (En fait la coloration évolue lentement, et ceci est dû à l'excès de réactif; mais comme toutes les mesures sont faites par rapport à un témoin, finalement on ne trouve aucune différence).

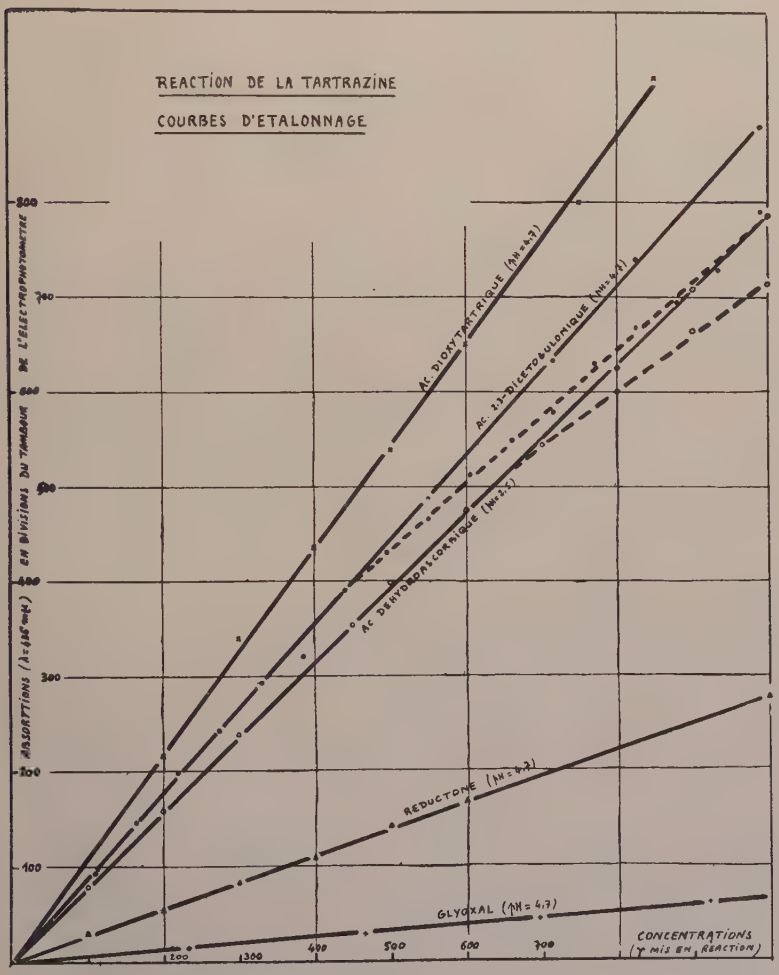


Fig. 10.

En conclusion, l'acide dioxytartrique donne avec la *p*-sulfophénylhydrazine une coloration jaune; la réaction, qui suit la loi de Beer-Lambert, est très lente à froid, mais maximum pour 10 à 20 min de chauffage au bain-marie bouillant. Le *p*H optimum est aux environs de 3,0.

Spécificité de la réaction. — L'acide dioxytartrique n'est pas seul à donner la réaction de la tartrazine. En premier lieu, nous envisagerons son produit de réduction, l'acide dihydroxymaléique.

Acide dihydroxymaléique. — L'acide dihydroxymaléique est tellement sensible à l'oxydation qu'il conduit pour ainsi dire automatiquement à l'acide dioxytartrique; aussi n'est-il pas surprenant que ses solutions donnent la réaction de la tartrazine; peut-être d'ailleurs réagit-il lui-même sous sa forme cétonique avec la *p*-sulfophénylhydrazine pour donner un dérivé monosubstitué, puis disubstitué : (cf. formule 1 page 16).

L'étude des spectres d'absorption des *p*-sulfophénylhydrazones (cf. fig. 11) nous a permis de montrer que l'acide dihydroxymaléique doit réagir au moins en partie sous sa forme cétonique, puisque le spectre du colorant formé est différent de celui que donne l'acide dioxytartrique : pour le premier, on observe un maximum d'absorption

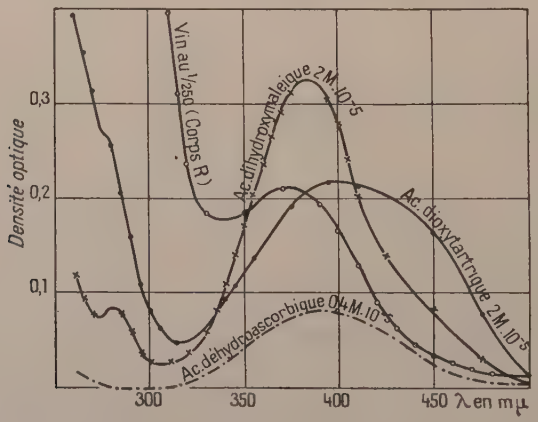


Fig. 11.

pour $\lambda = 280$ et 385 mμ alors que ce maximum est à $\lambda = 400$ mμ pour le second.

Quoi qu'il en soit il n'est pas possible par cette réaction de le séparer de l'acide dioxytartrique. Nous nous sommes trouvé devant le même problème avec les acides ascorbique et déhydroascorbique et nous avons été également amené à en doser la somme, après oxydation par l'iode du dérivé réduit.

Autre corps donnant la réaction de la tartrazine. — Nous avons publié par ailleurs, en 1951 et en 1953, une étude de la réaction de la tartrazine avec les corps suivants : acides ascorbique, déhydroascorbique et dicétogulonique, réductone, glyoxal, diacétyle, oses. Tous ces corps donnent une coloration jaune avec la *p*-sulfophénylhydrazine, dans des conditions de *p*H et de temps de chauffage variées; nous résumerons les conclusions auxquelles nous sommes parvenu dans le tableau XII où nous avons groupé les conditions expérimentales de réaction pour chaque corps. Nous y avons adjoint ce que nous avons appelé la « réaction micromoléculaire » qui désigne l'absorption

Tableau XII

	acide dioxytartrique	acide dicéto-gulonique	acide déhydro-ascorbique	réductone	glyoxal	diacétyle
vitesse de réaction à froid.	assez faible	très faible	très fai faible	très faible	assez faible	réaction rapide mais incomplète
temps optimum de chauffage en minutes	10-20	75-90	75-90	60-75	10-20	5
pH optimum de réaction	3,0	4,7	2,5	4,5-5,5	2,0-7,0	4,6
stabilité des solutions à froid.	très faible	excellente	excellente	excellente	excellente	excellente
stabilité des solutions à 100°.	nulle	nulle	nulle	excellente	excellente	excellente
réaction micromolé culaire.	153	170	134	24,5	3,7	4-6
poids moléculaire.	146	192	174	88	58	86

du colorant obtenu pour une micromolécule du corps mis en réaction. Enfin, la comparaison des stabilités des solutions à froid et au bain-marie nous a permis de proposer une méthode de dosage spécifique et sélective de tous ces corps, même lorsqu'ils se trouvent tous en mélange.

CHAPITRE IV

ACTION DU CUIVRE ET DU FER

Nous avons jusqu'ici étudié des solutions simples; nous allons maintenant montrer la fragilité de l'acide dioxytartrique, dès qu'on introduit dans la solution une trace de sel de métal lourd.

Action du cuivre sur l'acide dioxytartrique. — Si, à une solution d'acide dioxytartrique, on ajoute une trace de sulfate cuivrique, 2 mg par exemple, on observe que la réaction de la tartrazine est fortement diminuée, voire inhibée, selon les concentrations. Cette action inhibitrice du cuivre peut porter soit sur la réaction de la tartrazine elle-même, soit sur la destruction de l'acide dioxytartrique avant réaction : nous allons montrer qu'en réalité les deux phénomènes sont concomitants.

Influence sur la conservation des solutions. — Nous avons préparé cinq solutions d'acide dioxytartrique à environ 50 mg par litre, à pH = 3,5, pouvant renfermer plus ou moins de cuivre. La première solution a été préparée avec de l'eau dépourvue de cuivre, obtenue sur échangeur d'ions; la deuxième a été préparée avec de l'eau distillée dans un appareil en cuivre; les trois autres ont reçu respectivement : 0,5; 2,5 et 5,0 mg de cuivre par litre, sous forme de SO_4Cu, $5H_2O$. Sur ces cinq solutions nous avons suivi la destruction de l'acide dioxytartrique en fonction de « l'âge » des solutions en faisant de temps à autre la réaction de la tartrazine sur 5 cm³ de solution + 2 cm³ de réactif; pH = 3,0; 15 min de chauffage. Les solutions ont été conservées à 20° (tableau XIII).

TABLEAU XIII

Durée de conservation des solutions en minutes	Solution dans l'eau passée sur échangeurs d'ions	Solution dans l'eau distillée ordinaire	Solution à 0,5 mg Cu par litre	Solution à 2,5 mg Cu par litre	Solution à 5,0 mg Cu par litre
5	240	236	190	142	43
10	235	228	180	102	22
15	226	220	166	73	13
20	219	210	154	54	8
30	207	200	130	31	3
40	201	186	-	18	0
50	193	-	100	8	-
60	181	164	85	4	-
75	170	-	-	2	-
90	155	136	54	0	-
120	134	110	42	-	-
150	118	-	-	-	-
180	-	-	23	-	-
240	-	-	13	-	-
300	-	-	6	-	-
Temps de demi réaction en minutes	138	104	32	4	6

Si nous portons en abscisses le temps de conservation des solutions et en ordonnées les absorptions mesurées, nous obtenons une famille de courbes (cf. fig. 12) dont l'examen nous permet de tirer les conclusions suivantes.

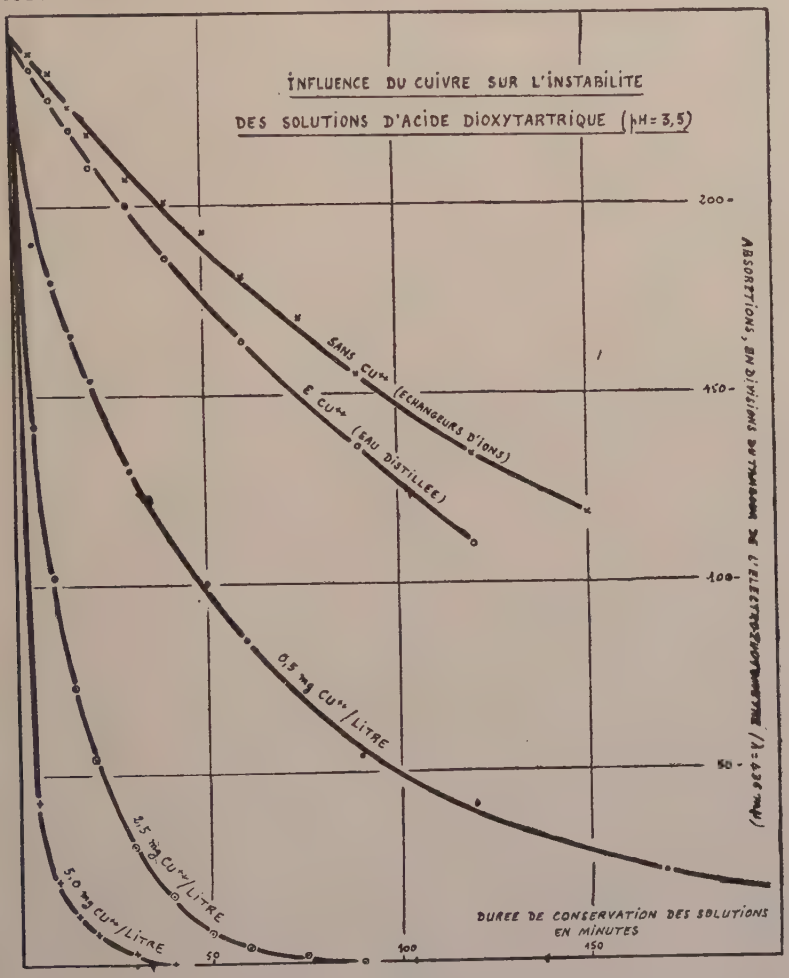
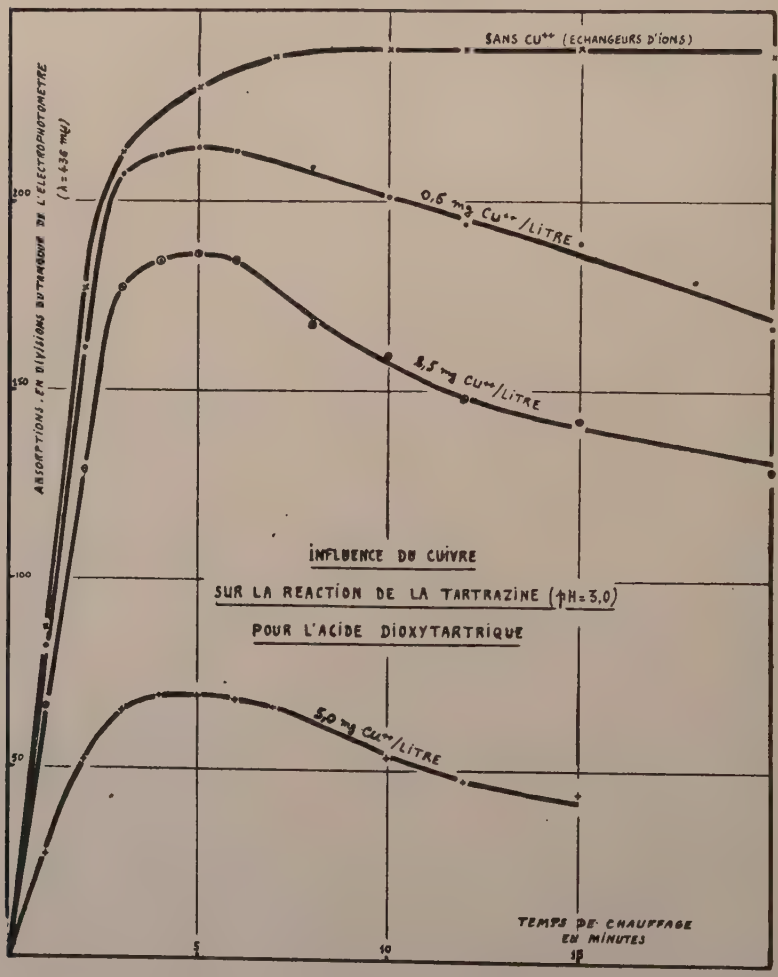


Fig. 12.

Tout d'abord, même sans aucune trace de cuivre, l'acide dioxytartrique se détruit spontanément en solution aqueuse. Dans l'eau distillée ordinaire, contenant toujours des traces de cuivre, cette destruction est un peu plus rapide et sa vitesse va s'accentuant quand on ajoute des quantités croissantes de cuivre, comme l'attestent les valeurs du temps de demi-réaction que nous avons portées dans le bas du tableau.

Donc le cuivre accélère la vitesse de destruction de l'acide dioxytartrique, et cette vitesse est fonction de la quantité de métal mise en jeu.

Influence sur la réaction de la tartrazine. — Sur des solutions identiques aux précédentes, nous suivons la réaction de la tartrazine en fonction du temps de chauffage : tous les tubes sont mis au bain-marie au même moment, alors que les solutions ne sont préparées que depuis 5 min.



Fig, 13.

En portant en abscisses les temps de chauffage et en ordonnées les absorptions, nous obtenons des courbes (cf. fig. 13) qui révèlent plusieurs phénomènes :

D'abord, après 15 min de chauffage, nous trouvons exactement les chiffres de l'expérience précédente pour les solutions âgées de 5 min : le phénomène est donc bien reproductible.

Comme il fallait s'y attendre l'intensité de la réaction est diminuée par le cuivre; chose plus curieuse, les courbes présentent non plus un palier entre 10 et 20 min, mais un maximum vers 5 min, puis une chute, correspondant à une destruction de la tartrazine formée.

Ce dernier phénomène est bien différent de la destruction de l'acide dioxytartrique, comme le montrent les expériences suivantes :

Tout d'abord, on introduit dans deux tubes à essais 5 cm³ de solution d'acide dioxytartrique sans cuivre, 2 cm³ de réactif et on chauffe 10 min. A ce moment, la coloration jaune a pratiquement atteint son maximum ; on introduit alors dans un des tubes un très petit cristal de sulfate de cuivre et on prolonge le chauffage pendant 10 min : le tube qui a reçu le cuivre se décolore à peu près totalement, alors que le deuxième garde évidemment sa couleur jaune : c'est donc bien le colorant, et non l'acide dioxytartrique, qui est détruit.

Dans une autre expérience, on prépare une solution à environ 100 mg par litre d'acide dioxytartrique ; on en met 5 cm³ dans une série de tubes à essais, puis 2 cm³ de réactif et on ajoute, juste avant la mise au bain-marie, des quantités croissantes de cuivre ; on mesure les absorptions après 15 min de chauffage (tableau XIV).

Tableau XIV

Cu++ ajouté, en γ.	0	4	8	12	16	20	24	40	60	80	100	120	140	160	180
Absorptions . .	528	493	483	448	408	365	336	188	108	59	26	17	7	0	0

Il faut donc environ 150 γ de cuivre pour inhiber la réaction de 500 γ d'acide dioxytartrique. Or nous avons vu au début de ce chapitre que pour détruire pratiquement 50 mg d'acide dioxytartrique à froid en 15 min, il suffit de 5 mg de cuivre, soit 50 γ de cuivre pour 500 γ d'acide et cela en milieu beaucoup plus dilué (un litre au lieu de 5 cm³). Il s'agit donc bien d'une action sur la réaction de la tartrazine.

Action du Fe^{+++} sur l'acide dioxytartrique. — Wieland et Franke signalent l'oxydation de l'acide dioxytartrique par les sels ferriques, conduisant pour un tiers à l'acide mésoxalique + CO_2, pour deux tiers à l'acide oxalique + $2CO_2$

Nous avons fait avec un sel ferrique les mêmes expériences qu'avec le cuivre, et nous en donnerons brièvement les résultats ; tous les essais ont été faits à partir de solutions à 50 mg d'acide dioxytar-

trique par litre, à pH = 3,5, pouvant recevoir une certaine quantité de Fe^{+++} sous forme d'alun $(SO_4)_3Fe_2$, $SO_4(NH_4)_2$, $24H_2O$.

Les réactions de la tartrazine sont faites à pH = 3,0 sur 5 cm³ de solution.

Influence du fer sur la conservation des solutions. — Nous avons suivi l'évolution, dans le temps, de quatre solutions : l'une sans fer, les trois autres ayant reçu respectivement 5, 12,5 et 25 mg Fe^{+++} par litre (tableau XV).

Nous trouvons les mêmes résultats que dans le cas du cuivre (cf. fig. 14) : le Fe^{+++} catalyse considérablement la destruction de l'acide dioxytartrique, mais il faut des quantités beaucoup plus

Tableau XV

Durée de conservation des solutions	Solution sans Fe+++	Solution à 5 mgFe+++ par litre	Solution à 12,5 mg Fe+++/litre	Solution à 25 mG Fe+++/litre
5	-	197	112	63
7	-	-	-	54
8	229	-	81	-
10	-	167	-	-
11	-	-	-	46
12	-	-	76	-
16	-	-	-	35
20	-	130	54	-
21	-	-	-	27
26	208	-	-	20
30	-	103	32	-
40	-	-	20	-
43	183	-	-	-
45	-	71	-	-
50	-	-	13	3
60	164	50	-	-
90	-	24	0	-
95	132	-	-	-
120	110	8	-	-
Temps de demi-réaction en minutes	107	23	5	2

considérables de fer que de cuivre : alors que 0,5 mg de cuivre font passer le temps de demi-réaction de 104 à 33, il faut 5 mg de Fe^{+++} pour avoir un phénomène du même ordre (temps de demi-réaction passé de 107 à 23).

Influence sur la réaction de la tartrazine. — Là encore, nous ne donnerons que les résultats de nos mesures, le mode opératoire étant identique à celui que nous avons utilisé pour le cuivre.

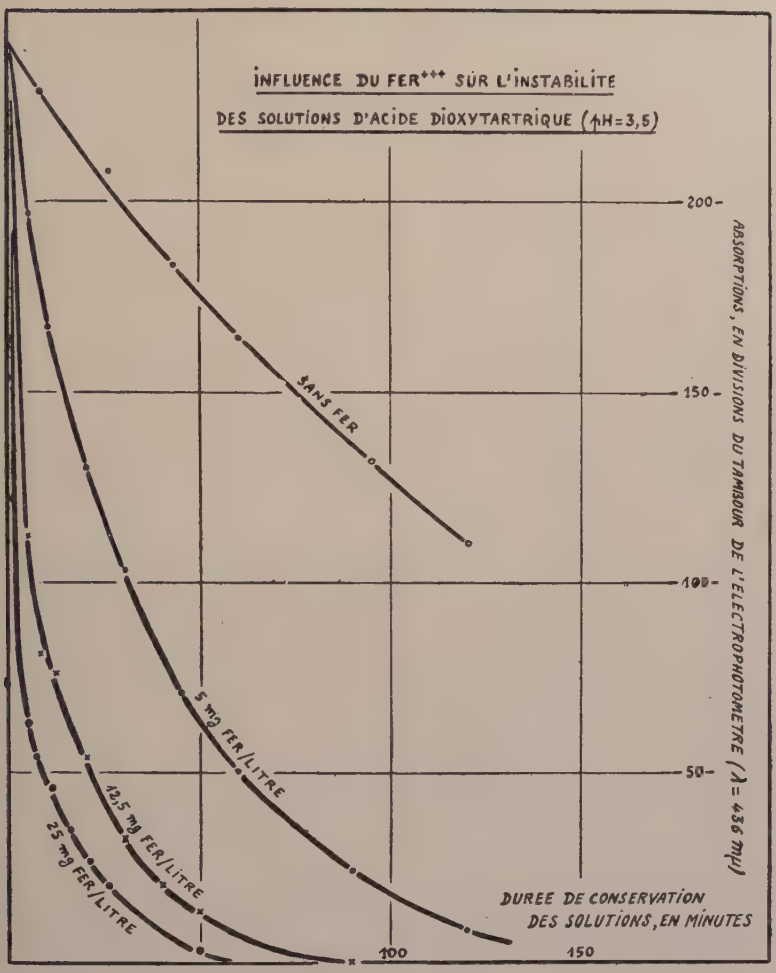


Fig. 14.

Les conclusions sont les mêmes que pour le cuivre : maximum de réaction pour 5 min de chauffage, puis destruction lente du colorant formé (cf. fig. 15).

Action du Fe^{++} sur l'acide dioxytartrique. — Nous avons enfin étudié le comportement d'une solution d'acide dioxytartrique en présence de sels ferreux. En effet l'action catalytique du Fe^{++} sur l'oxydation de l'acide dioxytartrique est connue depuis les travaux de Wieland et

Franke qui disent qne les sels ferreux ont la même action oxydante que les sels ferriques.

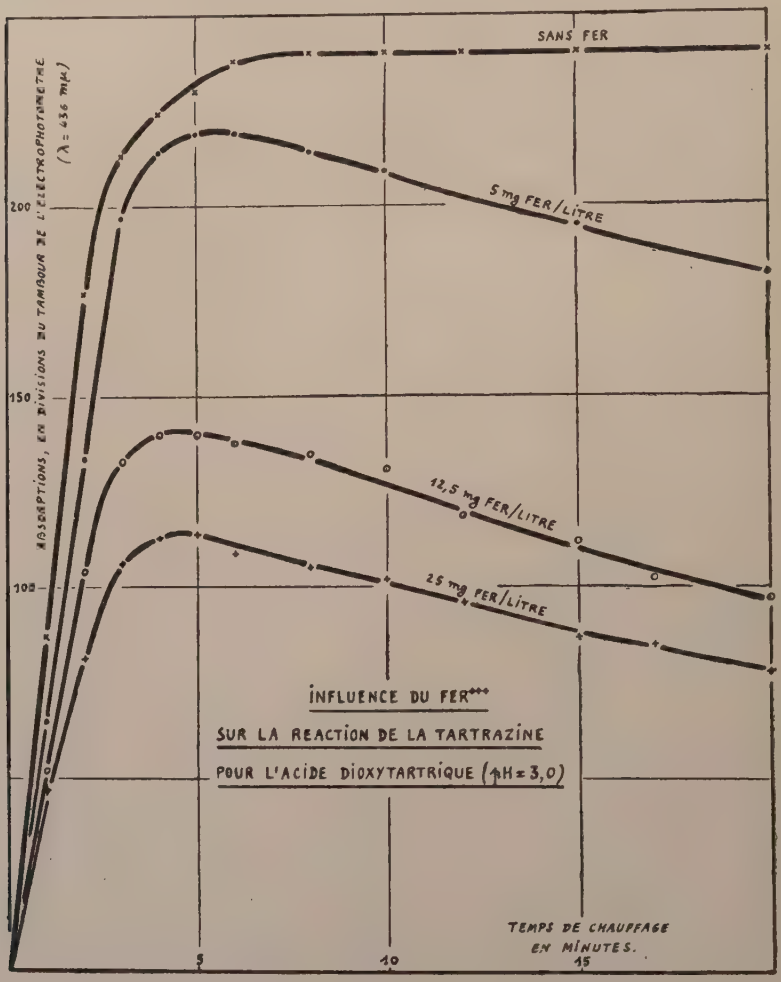


Fig. 15.

Pour cette étude nous avons préparé une solution d'acide dioxytartrique à environ 50 mg par litre que nous avons divisée en quatre parties, recevant respectivement 0,0 ; 2,24 ; 11,2 et 22,4 mg de Fe^{++} sous forme de sel de Mohr. Les solutions sont à pH = 3,0 et c'est à ce même pH que seront faites les réactions de la tartrazine, sur 5 cm³ de solution + 2 cm³ de réactif, 10 min de chauffage ; tubes complétés à 20 cm³ après réaction (tableau XVI).

Nous nous apercevons que la présence de Fe^{++} active considérablement la destruction de l'acide dioxytartrique, ainsi que le montrent les lectures d'absorptions, en fonction du temps de conservation des solutions.

TABLEAU XVI

Temps de conservation des solutions en minutes	Solution sans Fe++	Solution à 2,24 mg Fe++/litre	Solution à 11,2mg Fe++/lit.	Solution à 22,4 mg Fe++/litre
6	232	222	204	179
15	219	167	152	132
30	198	130	102	75
60	164	68	40	21
90	136	33	14	9
120	110	9	3	2
Temps de demi-réaction en minutes	107	34	24	17

Nous trouvons donc un phénomène analogue à celui qui est provoqué par le Fe^{+++} ; s'agit-il de deux phénomènes distincts ? Le Fe^{++} n'agit-il pas en passant tout d'abord à l'état de Fe^{+++} ? Mais un dosage du Fe^{+++}, après 90 min, donne 1,8; 2,25 et 2,25 mg Fe^{+++} par litre pour les trois solutions auxquelles a été ajouté du sel de Mohr. Pour la première, les 3/4 du fer sont à l'état ferrique ; cette proportion n'est que de 10 p. 100 pour la troisième solution, mais dans ce cas, les 2,25 mg de Fe^{+++}, nous l'avons vu à l'expérience précédente, suffisent à oxyder l'acide dioxytartrique mis en réaction.

Sans que nous puissions l'affirmer avec certitude, il semble donc bien que l'action du Fe^{++} se confonde en réalité avec celle du Fe^{+++}.

TROISIÈME PARTIE

ÉVOLUTION DES SOLUTIONS DE TARTRATE FERREUX

Après avoir étudié les acides dihydroxymaléique et dioxytartrique et leurs dérivés, nous avons examiné dans quelles conditions ces corps apparaissent et évoluent au sein d'une solution de tartrate ferreux.

Solution utilisée. — Dans 1 litre d'eau distillée, nous avons dissous 7,5 g d'acide tartrique : cette solution a été ensuite neutralisée au bicarbonate de façon à obtenir un *p*H de 3,8-3,1 ; nous y avons enfin dissous 392 mg de sel de Mohr, de sorte que nous avons obtenu une solution de tartrate ferreux, tamponnée à *p*H = 3, N/10 en ion tartrique et N/1 000 en ion ferreux (56 mg de Fe^{++} par litre).

CHAPITRE PREMIER

TECHNIQUES DE DOSAGE UTILISÉES

Dans cette solution nous avons effectué les dosages suivants qui devaient nous permettre de calculer les concentrations des corps apparus.

Dosage du Fe^{++}. — Dans un tube à essais on mélange 5 cm^3 de solution tampon acétique N à *p*H = 4,7, 1 cm^3 de solution d'α-α'-dipyridyle à 1 p. 100 dans l'alcool à 30 p. 100 et 5 cm^3 de la solution à doser ; il se développe une coloration rose ; on complète à 50 cm^3 et on mesure l'absorption à l'électrophotomètre pour $\lambda = 546$ mμ dans une cuve de 1 cm d'épaisseur. Nous avons établi dans les mêmes conditions une courbe d'étalonnage à partir d'une solution de sel de Mohr N/1 000, qui nous a permis d'établir qu'une absorption de 10 divisions du tambour de l'électrophotomètre correspond à une concentration de 4,10 mg de Fe^{++} par litre.

Dosage de Fe^{+++}. — On mélange 2 cm^3 d'acide chlorhydrique au 1/2, 1 cm^3 de sulfocyanure de potassium à 50 p. 100 et 5 cm^3 de la solution à doser. On complète à 50 cm^3 et on mesure à l'électrophotomètre pour $\lambda = 436$ mμ, l'absorption de la coloration rouge, dans la cuve de 1 cm ; comme pour Fe^{++}, nous avons établi une courbe de référence, selon laquelle 10 divisions de l'électrophotomètre correspondent à une concentration de 3,75 mg de Fe^{+++} par litre. Bien entendu, aussi bien pour Fe^{++} que pour Fe^{+++}, nous avons pour chaque mesure déduit l'absorption donnée par un essai-témoin (réactifs seuls).

Réaction de la tartrazine. — A 5 cm^3 de solution, on ajoute 5 cm^3 de solution tampon à *p*H = 4,7 et 2 cm^3 de réactif (*p*-sulfophénylhydrazine à 5 g par litre). On porte au bain-marie bouillant pendant 15 min ; on refroidit, on complète à 20 cm^3 et on mesure à l'électrophotomètre l'absorption du colorant jaune formé, pour

$\lambda = 436$ mμ, dans la cuve de 1 cm d'épaisseur; de cette mesure est déduite l'absorption d'un essai-témoin.

La courbe-étalon que nous avons établie indique que 10 divisions de l'électrophotomètre correspondent à 10,5 γ d'acide dioxytartrique dans la prise d'essai de 5 cm³, soit 2,10 mg/litre. Ceci correspond à A = (0,00288 × lecture) milliéquivalents de carbonyles par litre.

Dosage à l'iode en milieu alcalin. — 10 cm³ de solution sont neutralisés par du bicarbonate de sodium; on ajoute ensuite 2 cm³ d'une solution 2N de carbonate de sodium et 20 cm³ d'iode N/100. On attend 1 heure puis on revient en milieu acide par 5 cm³ d'acide chlorhydrique au 1/4 et on dose l'excès d'iode par l'hyposulfite N/100, soit D cm³. Parallèlement un essai à blanc donne T cm³. La quantité d'iode consommé est K = T — D, ce qui correspond K m.éq d'iode par litre.

Dosage des carbonyles totaux. — 25 cm³ de solution sont ajustés à *p*H = 4,0; on ajoute 10 cm³ de chlorhydrate d'hydroxylamine N/10 à *p*H = 4,0 également. On attend 20 min, puis on revient à *p*H = 4,0 par NaOH N/50 : soit *y* cm³.

On a : carbonyles totaux : C = 0,8 *y* m.éq par litre.

Dosage du pouvoir réducteur ou dichlorophénolindophénol. — A 10 cm³ de solution, on ajoute 20 cm³ de dichlorophénolindophénol N/1 000 tamponné à *p*H = 7,0; on attend 1 heure puis on titre l'excès de colorant par une solution N/1 000 d'acide ascorbique : soit D cm³. Un témoin parallèle donne T cm³ d'acide ascorbique.

On a : H réducteurs : R = 0,1 (T — D) m.éq par litre.

Dosage à l'iode en milieu alcalin après défécation plombique. — 50 cm³ de solution sont neutralisés par une pincée de carbonate de calcium, puis déféqués par 10 cm³ de sous-acétate de plomb. On filtre et lave le précipité; le filtrat est traité par 5 cm³ d'acide sulfurique 5N pour éliminer l'excès de plomb; on filtre, lave; le filtrat est neutralisé par le bicarbonate et complété à 200 cm³. Sur 100 cm³ de filtrat (= 25 cm³ de solution initiale) on dose par l'iode en milieu alcalin comme précédemment (dosage 4). On a : iode consommé : $M = \frac{2}{5}(T - D)$ m.éq par litre.

Dosage des composés bisulfitiques après défécation plombique. — Les 100 cm³ de filtrat qui restent de la défécation précédente (correspondant à 25 cm³ de solution initiale) sont ajustés à *p*H = 7 par 10 cm³ de tampon phosphaté N/10 puis on ajoute 5 cm³ de bisulfite

à 1 p. 100. Après 5 min on revient en milieu acide par ClH au 1/4, on détruit l'excès de bisulfite par l'iode, puis on passe à $p\mathrm{H} = 8{,}2$ à l'aide d'une solution boratée et on titre le bisulfite libéré par l'iode N/100, soit D cm^3. On fait parallèlement un essai-témoin, soit T cm^3. On a : iode consommé : $\mathrm{H} = 0{,}4\ (\mathrm{D} - \mathrm{T})$ m.éq par litre.

Calcul des concentrations. — *Acide dihydroxymaléique* (+ *acide réductonique*). — Ce sont les seuls composés, avec Fe^{++}, réduisant le dichlorophénolindophénol ; si on a F m.éq de Fe^{++} par litre, on a (R — F) m.éq d'acides dihydroxymaléique et réductonique par litre. Comme il y a 2 m.éq par millimolécule, on a :

$$\alpha = \frac{\mathrm{R} - \mathrm{F}}{2} \text{ m.mol par litre.}$$

On peut aussi doser directement par le dichlorophénolindophénol, en bloquant le Fe^{++} soit par l'α-α'-dipyridyle, soit par le cyanure de potassium en milieu neutre (L. Genevois et P. Cayrol).

Acide dioxytartrique. — Dosé par la réaction de la tartrazine ; celle-ci ayant donné A m.éq de fonctions carbonyles par litre, comme il y a deux fonctions carbonyles par molécule, on a $\frac{\mathrm{A}}{2}$ m.mol par litre. Il faut en retrancher l'acide dihydroxymaléique qui donne lui aussi la réaction de la tartrazine. Finalement :

$$\beta = \left(\frac{\mathrm{A}}{2} - \alpha\right) \text{ m.mol par litre.}$$

Acides-aldéhydes : acides glyoxylique et glyoxylcarbonique. — Ces deux corps sont les seuls qui soient à la fois précipitables par le sous-acétate de plomb et oxydables par l'iode sans l'être par le dichlorophénolindophénol. Ils seront donc donnés par le dosage à l'iode K duquel on retranchera le dosage après précipitation plombique M et le dosage au dichlorophénolindophénol (R — F). Il y correspond donc (K — M) — (R — F) m.éq/litre. Comme il y a 2 m.éq d'iode par millimolécule, on a finalement :

$$\gamma = \frac{(\mathrm{K} + \mathrm{F}) - (\mathrm{M} + \mathrm{R})}{2} \text{ m.mol par litre.}$$

Glyoxal. — Des deux corps non précipités par le plomb (aldéhyde glycolique et glyoxal), le glyoxal est le seul à donner une combinaison bisulfitique ; on a donc directement H m.éq d'iode/litre et comme il faut 4 équivalents d'iode par molécule de glyoxal :

$$(\mathrm{CHO} - \mathrm{CHO} + 4\mathrm{I} + 2\mathrm{H_2O} \rightarrow \mathrm{CO_2H} - \mathrm{CO_2H} + 4\mathrm{IH}),$$

on a finalement :

$$\delta = \frac{H}{4} \text{ m.mol par litre.}$$

Aldéhyde glycolique. — Evidemment donnée par la différence (M — H) m.éq d'iode par litre. Comme il faut deux équivalents d'iode par molécule d'aldéhyde glycolique :

$$(CH_2OH - CHO + 2I + H_2O \rightarrow CH_2OH - CO_2H + 2IH)$$

on a :

$$\varepsilon = \frac{M - H}{2} \text{ m.mol par litre.}$$

Acide mésoxalique + acide glyoxylcarbonique. — Donnés par les carbonyles totaux C, desquels on aura retranché l'acide dioxytartrique A et tous les carbonyles réagissant avec l'iode K ; parmi ces derniers se trouve une fonction aldéhyde appartenant à l'acide glyoxylcarbonique $CO_2H - CO - CHO$, de sorte que la différence C — (A + K) m.éq carbonyles par litre représente en même temps le nombre de millimolécules :

$$\zeta = C - (A + K) \text{ m.mol par litre.}$$

CHAPITRE II

ÉTUDE DES SOLUTIONS

Une solution de tartrate ferreux a été préparée, comme nous l'avons indiqué, et abandonnée à la lumière et à la température (25°) du laboratoire, sans aucune précaution contre l'oxygène de l'air ; bien au contraire, après les dosages, la solution était agitée de façon à saturer d'oxygène.

Evolution de la solution. — Nous avons suivi pendant 31 jours, et les résultats ont été groupés dans le tableau XVII, dont nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

L'acide dihydroxymaléique apparaît en quantités toujours faibles ; la concentration maximum observée, 0,09 m.mol/litre (sensiblement 10^{-4}M) correspond il est vrai à 1,8 cm³ de dichlorophénolindophénol N/1 000 pour 10 cm³ de solution, ce qui n'est pas négligeable ; de toutes façons cet acide ne s'accumule pas, ce qui montre que les réactions de décarboxylation et d'oxydation de l'acide dihydroxymaléique ont des vitesses du même ordre que sa formation.

TABLEAU

Durée d'évolution en jours	Fer^{++} m.eq. par litre (F)	Tartrazine m.eq. CeO par litre (A)	Dosage par l'iode en milieu alcalin m.eq./litre (K)	Carbonyles totaux m.eq. par litre (C)	H réducteurs m.eq.par litre (R)	Dosage par l'iode en milieu alcalin, après pp. par Pb m.eq./litre (M)	Combiné bisulfite après pp. par Pb m.eq. par litre (H)
1	0,96	0,55	-	-	0,96	-	-
2	1,00	0,62	0,82	-	1,00	0,8	-
3	0,95	0,68	1,75	3,6	1,13	1,6	-
4	0,84	0,84	2,1	4,25	0,97	1,92	-
7	0,76	1,18	3,0	5,92	0,77	1,72	-
8	0,74	1,22	3,3	6,8	0,79	1,96	-
9	0,72	1,37	3,3	8,96	0,775	1,89	0,56
21	0,57	1,43	3,7	5,6	0,58	2,32	0,44
23	0,50	1,53	3,65	7,0	0,535	2,2	0,40
31	0,51	1,90	4,2	7,2	0,53	2,4	0,36

TABLEAU

23	OBSCURITÉ	0,70	1,39	3,4	5,84	0,73	1,7	0,4
31	OBSCURITÉ	0,58	1,75	4,5	6,8	0,55	4,48	1,28
23	LUMIÈRE	1,00	1,41	4,5	8,4	1,17	2,6	0,48
31	LUMIÈRE	1,00	2,82	5,6	8,8	0,98	4,52	1,76

TABLEAU

3	0,74	0,80	0,9	2,8	0,85	0,78	0,12
5	0,73	1,00	1,2	3,5	0,81	1,08	0,24
9	0,66	1,24	3,1	5,84	0,86	2,48	0,72
15	0,57	1,64	7,1	10,32	0,93	5,96	2,76

XVII

Durée d'évolution en jours	Dosages des divers composés exprimés en millimolécules par litre.					
	ac. dihydroxy-maléique + ac réductonique	ac. dioxy-tartrique	ac. Glyoxylique + ac. glyoxyl-carbonique	aldéhyde glycolique	Glyoxal	ac. méso-xalique + ac. glyoxyl-carbonique
	α	β	γ	ε	δ	ζ
1	0,00	0,28	0,00	-	-	-
2	0,00	0,31	0,01	-	-	-
3	0,09	0,34	0,00	-	-	1,17
4	0,06	0,42	0,03	-	-	1,30
7	0,00	0,59	0,64	-	-	1,74
8	0,02	0,61	0,63	-	-	2,28
9	0,02	0,69	0,66	0,66	0,14	4,29
21	0,00	0,71	0,69	0,94	0,11	0,47
23	0,01	0,77	0,70	0,88	0,10	1,82
31	0,01	0,95	0,88	1,02	0,09	1,10

XVIII

23	OBSCURITÉ	0,01	0,70	0,84	0,64	0,10	1,05
31		0,00	0,88	0,01	1,60	0,32	0,55
23	LUMIÈRE	0,08	0,70	0,87	1,06	0,12	0,49
31		0,00	1,41	0,54	1,40	0,44	0,38

XIX

3	0,055	0,34	0,0	0,33	0,03	1,1
5	0,04	0,46	0,03	0,42	0,06	1,3
9	0,10	0,52	0,20	0,88	0,18	1,5
15	0,18	0,64	0,40	1,60	0,69	1,6

Acide dioxytartrique : Une grande partie de l'acide dihydroxymaléique s'oxyde immédiatement en acide dioxytartrique ; comme les vitesses de décarboxylation et d'oxydation de cet acide sont moins rapides, ainsi que nous l'avons vu, que celles de son précurseur, il finit par s'accumuler pour atteindre, en 31 jours, une concentration voisine de M/1 000.

Acide glyoxylique + acide glyoxylcarbonique : Cette accumulation n'empêche pas qu'une grande partie de l'acide dioxytartrique se décarboxyle et s'oxyde en acides glyoxylcarbonique et glyoxylique, que l'on trouve, en fin d'expérience, à la concentration M/1 000 environ.

Glyoxal : Une petite partie de l'acide dioxytartrique se décarboxyle mais échappe à l'oxydation, ce qui conduit à la formation de petites quantités de glyoxal (10^{-4} M au bout de 31 jours).

Acide mésoxalique : Mais la plus grosse partie de l'acide dioxytartrique est décarboxylée et oxydée en acide mésoxalique, qui atteint, en 9 jours, la concentration de 4,3 M/1 000, soit près de M/200. Cet acide est ensuite détruit et conduit à l'acide glyoxylique et surtout à l'acide oxalique.

Aldéhyde glycolique : Si la majorité de l'acide dihydroxymaléique est oxydée en acide dioxytartrique, une partie non négligeable est décarboxylée en aldéhyde glycolique (concentration finale M/1 000 environ) ; sans doute une grande partie de cet aldéhyde est-elle oxydée en acide glycolique.

Acide oxalique : Nous n'avons pu doser l'acide oxalique (par suite de la précipitation du tartrate de calcium) mais une précipitation qualitative par le chlorure de calcium indique une forte proportion de cet acide, révélée par une précipitation immédiate (l'acide tartrique précipite à la longue) : c'est d'ailleurs le produit logique de l'évolution.

*
* *

Influence de l'éclairement et de l'aération. — La solution précédente a été scindée le 21e jour, en 3 fractions ; la première continuant d'évoluer comme précédemment; les deux autres ont été placées à l'abri de l'air, l'une à la lumière du laboratoire et directement insolée 2 heures par jour, l'autre à l'obscurité. Ces deux fractions, observées pendant 10 jours, révèlent que le fait de placer les solutions à l'abri de l'air modifie l'allure des phénomènes, mais l'influence de l'éclairement est encore plus considérable (tableau XVIII). Nous donnons les conclusions de cette expérience par rapport à la fraction de la solution qui est restée en contact avec l'air.

	Obscurité	Lumière
Fer++	croît légèrement	tout le fer passe à l'état ferreux
Ac. dihydroxymaléique.	reste faible	croît très vite puis disparaît
Ac. dioxytartrique . .	diminue légèrement	croît très fortement
Ac. glyoxylique . . .	tend à disparaître	diminue
Aldéhyde glycolique .	croît très fortement	croît très fortement
Glyoxal	proportion triplée	proportion quadruplée
Acide mésoxalique . .	diminue fortement	diminue fortement

L'absence d'oxygène favorise donc la formation des corps réduits, comme il est logique (aldéhyde glycolique et glyoxal); la lumière favorise la formation d'acide dioxytartrique alors qu'à l'obscurité cet acide tend à disparaître.

Influence de la température. — Les expériences précédentes, faites à 25°, montrent que l'acide dihydroxymaléique se détruit aussi vite qu'il se forme. Nous avons préparé une autre solution que nous avons placée à 9°-10° et que nous avons suivie pendant 15 jours. La solution était placée à l'abri de l'air sauf les jours de dosage, où la solution était agitée pour être saturée d'oxygène.

Des dosages effectués (tableau XIX), on peut déduire qu'en ce qui concerne l'acide dioxytartrique et l'acide glyoxylique, la température ne semble pas avoir d'influence. Par contre, il se forme moins d'acide mésoxalique, et davantage de glyoxal, ce qui est normal puisqu'on est à l'abri de l'oxygène. Enfin on voit apparaître des quantités appréciables d'acide dihydroxymaléique puisqu'au bout de 15 jours on a une concentration d'environ 0,2 M/1 000 au lieu de 0,02 M/1 000 à 25°. Comme on est à l'abri de l'air, il se forme de plus grandes quantités d'aldéhyde glycolique.

Nous avons analysé une solution, toujours identique aux précédentes, mais conservée depuis 13 mois sur une étagère du laboratoire ; nous y avons trouvé :

Acide dihydroxymaléique .	0,0 m.mol/litre
Acide dioxytartrique . . .	0,5 m.mol/litre
Acide glyoxylique. . . .	5,86 m.mol/litre
Aldéhyde glycolique . . .	1,14 m.mol/litre
Glyoxal	0,69 m.mol/litre
Acide mésoxalique. . . .	0,64 m.mol/litre
Acide oxalique.	de l'ordre de 10 m.mol/litre

Nous trouvons donc un peu d'acide dioxytartrique, un peu d'acide mésoxalique et des doses plus ou moins fortes des corps en C_2, principalement d'acide oxalique.

Influence du *p*H. — Les essais que nous avons faits, pour des *p*H compris entre 2,8 et 3,5, qui sont les *p*H extrêmes des vins, n'ont marqué aucune influence du *p*H. Les variations que l'on observe sont irrégulières, et ne peuvent être imputées qu'aux expériences elles-mêmes, car il est bien évident que deux expériences identiques donneront des chiffres semblables mais jamais égaux.

Répétons que seul le fer^{++} a une action catalytique : une solution de tartrate ferrique reste intacte même après plusieurs semaines.

En conclusion. — L'évolution d'une solution de tartrate ferreux conduit à la formation de corps en C_2 : acide oxalique, acide glyoxylique, aldéhyde glycolique, glyoxal (et aussi acide glycolique que nous n'avons pu doser) par l'intermédiaire de corps en C_3 (acides tartronique et glyoxylcarbonique principalement) et de corps en C_4 (acides dihydroxymaléique et dioxytartrique).

L'oxygène est évidemment indispensable, mais lorsqu'il est introduit en quantités limitées, il favorise la formation de corps réduits, tels que l'acide dihydroxymaléique, l'aldéhyde glycolique et le glyoxal, cette formation étant catalysée par la lumière.

Une température basse (10°) permet de mettre plus aisément en évidence l'acide dihydroxymaléique, car aux températures plus élevées la destruction de ce corps est aussi rapide que sa formation.

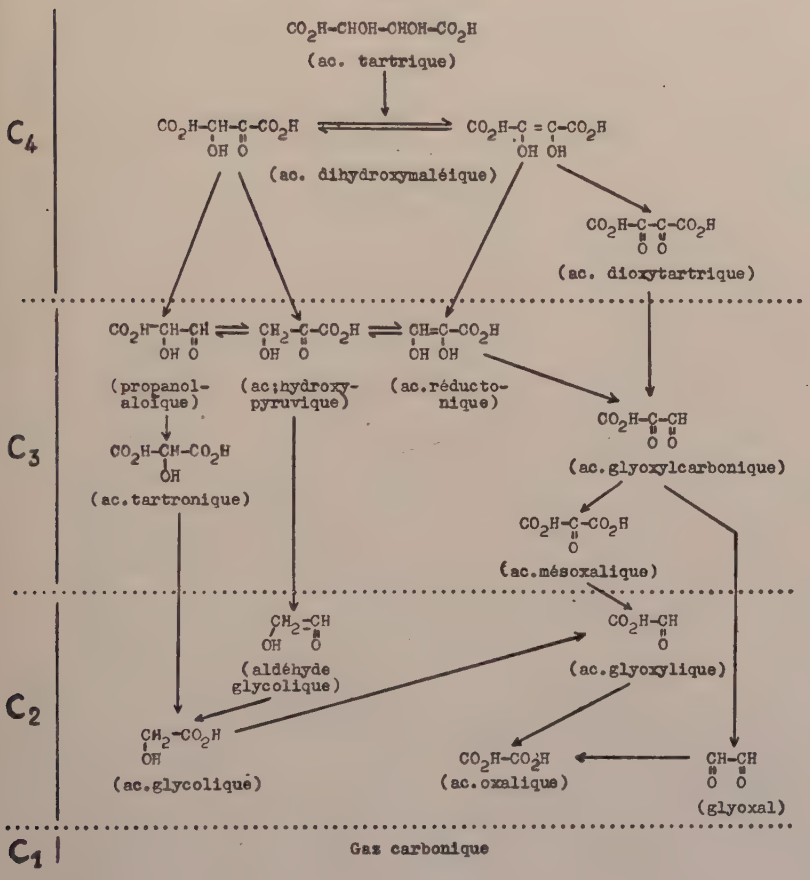
Il suffit donc d'une trace de sel ferreux pour détruire un corps aussi stable que l'acide tartrique, et ce jusqu'au terme ultime de la dégradation qui est le gaz carbonique. Cette destruction se fait par une suite de réactions de décarboxylation que nous résumons dans le tableau XX. De ce tableau, une petite partie n'a pu être vérifiée ; c'est le passage du propanolaloïque à l'acide glycolique par l'intermédiaire de l'acide tartronique ; malgré cette lacune, due au manque de réactions spécifiques, nous avons incorporé ces corps dans notre tableau, tant leur présence est vraisemblable, voire évidente, et d'ailleurs citée par certains auteurs (Lachman).

Au demeurant, l'acide glycolique et plus encore l'acide tartronique ne jouent que le rôle d'intermédiaires, du moins tant que la solution contient des sels ferreux. En effet, en présence de Fe^{++}, l'acide glycolique est oxydé en acide glyoxylique et l'acide tartronique en acide mésoxalique ; nous avons vérifié ces réactions indiquées par Fenton en 1900 pour l'acide glycolique.

Ceci est encore plus vrai dans les milieux biologiques où intervient l'action d'enzymes ; en 1949, Clagett, Tolbert et Burris ont en effet découvert dans plusieurs plantes une oxydase capable de détruire l'acide glycolique en acide formique et CO_2, par l'intermédiaire de l'acide glyoxylique ; Zelitch et Ochoa ont tout récemment repris cette question et ont extrait cet enzyme des feuilles d'épinard, alors que Kun l'avait trouvé dans le foie des mammifères en 1952.

Tableau XX

TABLEAU DES PRODUITS D'OXYDATION ET DE DECARBOXYLATION ISSUS DE L'ACIDE TARTRIQUE EN PRESENCE DE SELS FERREUX



Des travaux ultérieurs de Zelitch et Ochoa ont permis d'isoler également des feuilles d'épinard une réductase capable de redonner l'acide glycolique à partir de l'acide glyoxylique.

Nous nous trouvons donc en présence d'un nouveau système transporteur d'hydrogène, et ceci montre tout l'intérêt que présente l'étude

des dérivés de l'acide tartrique, des points de vue biologique et physiologique.

A ce double point de vue, tous les corps issus de l'acide tartrique n'ont pas le même intérêt, étant donnée leur instabilité plus ou moins grande. Dans le tableau ci-dessous, nous avons exprimé cette instabilité par la « vie moyenne » de chaque corps, c'est-à-dire le temps, en minutes, nécessaire à la décarboxylation ou l'oxydation de la moitié de la quantité mise en solution.

Les deux corps en C_4, acides dihydroxymaléique et dioxytartrique ont une vie moyenne très courte, de quelques heures au plus, de quelques minutes en présence de traces de cuivre ou de fer. Les corps en C_3 ne sont guère plus stables.

Seuls les dérivés en C_2 sont stables en solution et de ce fait pourront présenter un intérêt biologique; c'est le cas, en particulier, de

Tableau XX *bis*

Vies moyennes en minutes à 20°.

	À l'abri de l'oxygène			En présence d'oxygène				
	m.eq.de cuivre/l			m.eq.de Cu ou Fe^{+++}/l				
	0	8	32	0	80Cu	400Cu	90Fe	220Fe
Ac.dihydroxymaléique	780	360	240	-	-	-	-	-
Ac.dioxytartrique	1260	-	-	140	35	7	22	5
Ac.réductonique	4320	1440	1200	-	-	-	-	-
Ac.glyoxylcarbonique	7200	-	-	-	-	-	-	-
Aldéhyde glycolique	S	S	S	S	-	-	-	-
Glyoxal	S	S	S	S	-	-	-	-
Ac.glyoxylique	S	S	S	S	-	-	-	-
Ac.oxalique	S	S	S	S	-	-	-	-

(S = bonne stabilité)

l'acide glyoxylique, de plus en plus considéré comme un constituant essentiel, permettant chez l'animal la synthèse biologique du glycocolle, et partant, de la créatine.

QUATRIÈME PARTIE

LES PRODUITS D'OXYDATION DE L'ACIDE TARTRIQUE DANS LE CAS DES VINS

Nous avons cherché à identifier les produits d'oxydation de l'acide tartrique dans un milieu naturel, en l'occurrence le vin qui, sous nos climats, est un des rares milieux biologiques où se rencontre l'acide tartrique ; en fait, l'acide tartrique a été signalé dans 118 plantes mais Franzen et Helwert ont analysé 82 de ces plantes et n'ont trouvé l'acide tartrique que dans 6 d'entre elles. Signalons toutefois que Schmalfuss (1923) a décelé l'acide dihydroxymaléique dans une Papavéracée, *Glaucium luteum*, où il en a trouvé 1,07 p. 100 des acides totaux, soit 40 mg par kilogramme de plante.

Dans un milieu aussi complexe qu'un vin, les techniques que nous avons utilisées jusqu'ici sur des solutions ne renfermant que des dérivés tartriques ne pouvaient être appliquées. Nous avons fait appel au dosage des fonctions carbonyles par précipitation fractionnée de 2.4-dinitrophénylhydrazones ; après séparation et purification, le précipité est redissous dans une solution alcoolique de soude et titré par le trichlorure de titane en milieu acide.

CHAPITRE PREMIER

TECHNIQUES UTILISÉES

Précipitation fractionnée des 2.4-dinitrophénylhydrazones. — Pour obtenir un précipité de 2.4-dinitrophénylhydrazone, nous avons utilisé la technique suivante, préconisée par Genevois : un volume V de vin est acidifié par l'acide chlorhydrique pur de façon que le milieu soit finalement 2N en ClH, puis on ajoute un volume V de 2.4-dinitrophénylhydrazine en solution aqueuse saturée ; on tiédit pour activer la précipitation et on abandonne plusieurs jours (ici 5 jours) à la température du laboratoire, on porte finalement 24 heures à la glacière pour terminer la précipitation.

Nous avons de la sorte préparé les fractions suivantes :

Vin total : sur 50 cm³ (précipité I).

Après défécation plombique : 100 cm³ de vin sont neutralisés par une pincée de carbonate de calcium puis déféqués par 25 cm³ de sous-

acétate de plomb ; on filtre et lave le précipité. Le filtrat est alors précipité par la dinitrophénylhydrazine (précipité II).

Après défécation barytique : 200 cm³ de vin sont neutralisés par le carbonate de calcium, puis additionnés de 25 cm³ de solution saturée de chlorure de baryum et de 100 cm³ d'alcool. On abandonne une nuit à la glacière, puis on filtre, lave, et on complète le filtrat à 250 cm³.

Ce filtrat est alors divisé en deux parties :

α) Sur 125 cm³ de ce filtrat, on précipite les dinitrophényl'hydrazones (précipité III).

β) Les 125 autres centimètres cubes sont distillés sous vide, à $pH = 4$, pour chasser les aldéhydes volatiles. On recueille 20 cm³ environ de distillat, que l'on précipite par la dinitrophénylhydrazine (précipité V). Quant au résidu de distillation, il est également précipité par le même réactif (précipité IV).

Dosage des dinitrophénylhydrazones : Après 7 jours, tous les précipités sont séparés par centrifugation et lavés par l'acide chlorhydrique 2N ; quand les eaux de lavage sont incolores, on redissout le précipité dans une solution N/10 de soude alcoolique, et on complète à 100 cm³.

On prélève 10 cm³ de la solution obtenue, correspondant à 5 cm³ de vin initial dans le cas du précipité I (vin total) et 10 cm³ de vin initial dans le cas des autres précipités ; on acidifie fortement par l'acide chlorhydrique, et on ajoute 20 cm³ de trichlorure de titane en solution environ N/50 ; on porte à ébullition que l'on maintient jusqu'à décoloration, c'est-à-dire disparition de la coloration jaune, faisant place à la couleur améthyste de Cl_3Ti. On ajoute 1 cm³ de sulfocyanure de potassium à 50 p. 100 et on titre l'excès de sel titaneux par une solution N/100 de sulfate ferrique ; les solutions de Cl_3Ti et de $(SO_4)_3Fe_2$ sont gardées dans des burettes automatiques sous gaz carbonique et tout le dosage est également effectué sous barbotage de CO_2 (Montage décrit par Genevois (1947)).

Les équations qui président à ce dosage sont :

(1) $$Cl_3Ti + ClH \rightarrow Cl_4Ti + H.$$

(2) $$\begin{matrix} R_1 \\ R_2 \end{matrix}\!\!>\!C=N-NH-C_6H_3(NO_2)-NO_2 + 16H \rightarrow \begin{matrix} R_1 \\ R_2 \end{matrix}\!\!>\!CH_2 + NH_2-NH-C_6H_3(NH_2)-NH_2 + 4H_2O.$$

(3) $$2Cl_3Ti + (SO_4)_3Fe_2 + 2ClH \rightarrow 2Cl_4Ti + 2SO_4Fe + SO_4H_2.$$

D'après ces équations, on voit qu'il faut 16 équivalents d'hydrogène réducteur pour une fonction carbonyle.

CHAPITRE II

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Nous avons étudié deux vins de Bordeaux, un rouge et un blanc; les résultats obtenus sont groupés dans le tableau XXI.

Tableau XXI

		cm^3 de Cl_3Ti N/50 consommés pour 10 cm^3 de vin	milliéquivalents H consommés par litre de vin.	microéquivalents de carbonyle par litre de vin.
VIN ROUGE	I. Vin total	8,0	16,0	1000
	II. Vin défèqué par Pb	4,5	9,0	562
	III. Vin défèqué par Ba	6,6	13,2	825
	IV. Vin défèqué par Ba et purifié par distillation	2,75	5,5	344
	V. Distillat	3,75	7,5	469
VIN BLANC	I. Vin total	15,5	31,0	1937
	II. Vin défèqué par Pb	9,5	19,0	1188
	III. Vin défèqué par Ba	11,85	23,7	1482
	IV. Vin défèqué par Ba et purifié par distillation	3,65	7,3	456
	V. Distillat	8,0	16,0	1000

La fraction III contient en plus les acides aldéhydes non précipités par le baryum, c'est-à-dire principalement l'acide glyoxylique.

La fraction IV est identique à la précédente, sauf qu'elle est débarrassée des aldéhydes volatils, c'est-à-dire principalement l'acétaldéhyde.

Enfin, la fraction V ne contient que les aldéhydes volatils.

En résumé, nous avons (tableau XXII) :

Tableau XXII

Fraction	Diacides (ac.dioxytartrique	Monoacides (ac.glyoxylique)	Aldéhydes fixes (aldéhyde glycolique et glyoxal	aldéhydes volatiles (acétaldéhyde)
I	•	•	•	•
II			•	•
III		•	•	•
IV		•	•	
V				•

La fraction I contient évidemment la totalité des fonctions carbonyles.

La fraction II est débarrassée des carbonyles acides et il n'y reste que les aldéhydes simples.

De ce tableau nous tirons :

Diacides = I — III.
Monoacides = III — II.
Aldéhydes fixes = II — V.
Aldéhydes volatils = V.

La fraction IV ne sert que de contrôle ; en effet nous devons trouver III = IV + V.

En fait, nous avons (tableau XXIII) :

Nous avons donc dosé (tableau XXIV) :

TABLEAU XXIII

	Vin rouge	Vin blanc
III	825	1 482
IV + V	813	1 456
Écart	1,4 p. 100	1,7 p. 100

TABLEAU XXIV

	Vin rouge	Vin blanc
Aldéhydes volatils	469 μ.eq./litre=4,7.10^{-4}N	1000 μ.eq./litre= 10^{-3}N
Aldéhydes fixes	93 μ.eq./litre=0,9.10^{-4}N	188 μ.eq./litre= 1,9.10^{-4}N
Monoacides	263 μ.eq./litre=2,6.10^{-4}N	294 μ.eq./litre= 2,9.10^{-4}N
Diacides	175 μ.eq./litre=1,7.10^{-4}N	455 μ.eq./litre=4,5.10^{-4}N
Carbonyles totaux	1000 μ.eq./litre=10^{-3}N	1937 μ.eq./litre=1,9.10^{-3}N

La proportion de diacides (175 et 455 μ.éq/litre) semble indiquer une assez forte quantité d'acide dioxytartrique ; de fait, si on fait la réaction de la tartrazine, on trouve une absorption, pour 10 cm³ de vin, de 270 dans le cas du vin rouge, 292 dans le cas du vin blanc.

Mais si nous regardons les choses d'un peu plus près, nous nous apercevons qu'il ne s'agit pas d'acide dioxytartrique, car nous avons la même réaction de la tartrazine avant et après chauffage du vin au bain-marie ; s'il s'agissait d'acide dioxytartrique, très thermolabile, nous ne trouverions plus de réaction après le chauffage. Par ailleurs le spectre d'absorption du colorant formé est bien différent de celui que donne le dérivé de l'acide dioxytartrique (cf. fig. 11).

Nous sommes obligé d'anticiper ici sur le chapitre suivant, dans lequel nous montrerons qu'il s'agit en fait d'un « corps R » d'origine glucidique, de constitution non encore établie ; nous verrons que ce corps est précipité par le sous-acétate de plomb mais non par le baryum, de sorte qu'il est dosé ici en temps que monoacide. Nous avons aussi établi qu'une absorption de 271,5 pour 10 cm³ de vin traité dans la réaction de la tartrazine correspond à 100 μ.éq de carbonyles du « corps R » par litre de vin.

Dans le cas présent, cela correspond à 99 μ.eq/litre pour le vin rouge et 107 μ éq/litre pour le vin blanc. La proportion de monoacides se trouve diminuée d'autant, tandis que toute la fraction diacide doit être comptée comme acide mésoxalique. Nous avons donc finalement (tableau XXV) :

Tableau XXV

	Vin rouge	Vin blanc
aldéhydes volatils (CH_3CHO)	469 μ.eq/litre	1000 μ.eq./litre
aldéhydes fixes ($CH_2OH-CHO$ et $CHO-CHO$)	93 μ.eq/litre	188 μ.eq./litre
Monoacides ($CHO-CO_2H$)	164 μ.eq./litre	187 μ.eq./litre
"Corps R"	99 μ.eq./litre	137 μ.eq./litre
Diacides ($CO_2H-CO-CO_2H$)	175 μ.eq./litre	455 μ.eq./litre

Nous avons donc retrouvé dans les vins des dérivés de l'acide dioxytartrique (acide mésoxalique, acide glyoxylique et glyoxal) et des dérivés de l'acide dihydroxymaléique (aldéhyde glycolique) mais sans aucune trace dosable de ces deux acides eux-mêmes; la présence de leurs dérivés prouve qu'ils se forment cependant ; la seule explication que nous trouvions à ce phénomène est que leur vitesse de destruction, par décarboxylation et par oxydation, est aussi grande que leur vitesse de formation.

Or, l'étude des solutions simples de ces deux acides nous a montré que la vitesse de destruction est inférieure à la vitesse de formation ; pourquoi les acides dihydroxymaléique et dioxytartrique ne s'accumulent-ils pas dans les vins comme dans les solutions de tartrate ferreux, tout au moins en quantité dosable ?

Nous pensons qu'il faut invoquer en premier lieu la présence de fer^{+++} et de cuivre, que l'on trouve dans tous les vins et qui ont une action catalysante très grande sur la destruction de ces acides ; peut-être faut-il invoquer l'action d'enzymes ; dès 1915 Neuberg et Schwenk ont signalé que la carboxylase de la levure attaque l'acide dihydroxymaléique et conduit ainsi à l'aldéhyde glycolique : il n'est pas interdit de penser que le vin puisse contenir de tels enzymes, bien que nous n'ayons pas pu les mettre en évidence ; l'acide dioxytartrique, ajouté à un vin ayant subi ou non un chauffage à l'ébullition à $pH = 3$, disparaît avec la même vitesse dans les deux cas ; s'il y avait eu une carboxylase, elle aurait été détruite par l'ébullition.

Quant au « corps R », sa présence dans les vins nous a paru d'une importance justifiant que nous lui consacrions quelques pages.

CINQUIÈME PARTIE

LE « CORPS R » DES VINS

L'absence d'acide dioxytartrique dans le vin était un phénomène inattendu et qui nous a incité à multiplier les expériences pour pouvoir le confirmer. Nous avons fait des essais sur de nombreux vins très différents par la provenance, l'âge, la durée de conservation en bouteille, le taux de sucres, le degré alcoolique : tous nous ont porté aux mêmes conclusions : l'absence d'acide dioxytartrique et la présence d'un corps inconnu, que nous appelons « corps R ». Notre technique de dosage ne peut être mise en cause puisque si nous ajoutons une certaine quantité d'acide dioxytartrique à un vin, nous la retrouvons par notre dosage immédiatement après son introduction. Quelques heures plus tard, il n'en reste plus trace (tableau XXVI).

Tableau XXVI

	Vin initial	Vin additionné de 500 mg d'acide dioxytartrique par litre.	
		après 10 minutes	après 5 heures
Absorption dûe au "corps R"	66	65	66
Absorption dûe à l'acide dioxytartrique + "corps R"	65	321	65
Ac. dioxytartrique en mg par litre de vin initial	0,0	487,5	0,0

Parmi les produits pouvant être identifiés au « corps R » nous devons, *a priori*, éliminer les aldéhydes simples, les cétones simples, les acides monocétoniques (type acide pyruvique) qui ne donnent pas la réaction de la tartrazine. Le diacétyle, aux concentrations auxquelles on le trouve dans les vins (1), et encore plus dans le vin

(1) Le taux de diacétyle ne dépasse pas 1 mg par litre pour les vins français, et reste toujours inférieur à 2 mg par litre dans les vins d'Algérie (E. Peynaud et M. Lafon).

dilué au 1/10, ne peut gêner. Nous avons également publié en 1953 qu'il ne s'agit pas d'acide ascorbique, absent de tous les vins que nous avons pu étudier.

Nous ne pouvons pas davantage incriminer des corps flavoniques ou anthocyaniques, ou les tannins, puisque le vin donne la réaction avant et après décoloration par le charbon actif, avant et après extraction par l'acétate d'éthyle.

Restent les glucides qui, comme nous l'avons publié en 1953, donnent une réaction parasite. Par ailleurs, nous rappelant les travaux de Geloso, selon lesquels le potentiel d'oxydo-réduction des vins serait dû à des dérivés de dégradation des glucides, nous nous sommes orienté vers cette hypothèse, la réaction parasite des oses ne permettant pas d'expliquer tout le phénomène, ni qualitativement ni quantitativement.

Modes de formation du « corps R » aux dépens du glucose. — Ces produits de dégradation du glucose peuvent être produits soit par fermentation soit par chauffage dans certaines conditions de *p*H.

Si on fait fermenter une solution de glucose à environ 100 g par litre massivement ensemencée par une culture pure de levure apiculée, avec ou sans « facteur Z », en présence des sels minéraux indispensables, la réaction de la tartrazine révèle l'apparition d'un corps donnant cette réaction ; on a laissé fermenter pendant 3 jours à l'étuve à 30°, puis on a fait la réaction de la tartrazine sur 5 cm³ de solution. Ainsi, trois jours de fermentation font apparaître dans les solutions une quantité de « corps R » équivalent à 8-13 mg d'acide ascorbique par litre (tableau XXVII).

Tableau XXVII

	absorptions mesurées pour 5 cc	L - T	"corps R" apparu, exprimé en mg d'ac. ascorbique par litre
Solution L_1 (sans facteur Z)	116	40	8,1
Solution L_2 (avec facteur Z)	141	65	13,2
Témoin non fermenté (avec ou sans facteur Z)	76		

Nous avons étudié ensuite dans quelles conditions de *p*H ce « corps R » apparaît lorsqu'on chauffe une solution de glucose.

Dans des tubes à essais, on met 10 cm³ de solution de glucose à 1 g par litre préalablement amenés à un *p*H variant entre 2,45 et 7,7. Cette solution est N/10 en acide borique, de façon à se trouver dans les mêmes conditions que le vin que nous étudierons ensuite. On

chauffe pendant 15 min au bain-marie bouillant, puis on refroidit, on ajoute 2 cm³ de réactif, on ajuste tous les tubes à pH = 2,2 et on reporte au bain-marie pendant 1 heure. Après quoi on complète à 20 cm³ et on mesure les absorptions (cf. fig. 16).

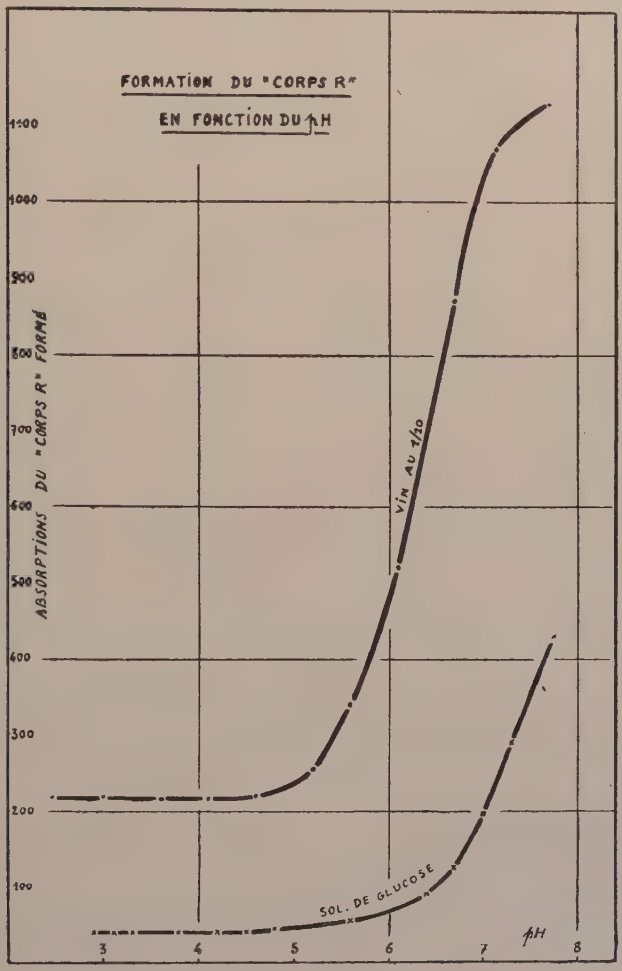


Fig. 16.

Si on fait subir un traitement identique à un vin dilué au 1/10 en milieu N/10 en acide borique, on observe que pour un chauffage à un pH supérieur à 4,6 environ, il apparaît une certaine quantité de « corps R », quantité qui est d'autant plus considérable que le pH s'élève (cf. fig. 16).

Il est donc incontestable que le chauffage d'un vin ou d'une solution de glucose avant réaction fait apparaître le « corps R » en quantité importante pour un *p*H supérieur à 4,6 et qu'en dessous de ce *p*H il n'apparaît ni ne disparaît de « corps R ».

Réaction du « corps R » en fonction du *p*H. — Nous préparons une solution de glucose à *p*H = 7,4, N/10 en acide borique, et nous la chauffons pendant 20 min au bain-marie pour faire apparaître une certaine quantité de « corps R ». Puis on réalise une gamme de tubes contenant 10 cm³ de cette solution + 2 cm³ de réactif, ajustés à des *p*H allant de 1,5 à 6,5. On porte tous les tubes au bain-marie pendant 60 min; on complète à 20 cm³ et on mesure les absorptions. On opère de même avec un vin dilué au 1/10, N/10 en acide borique, mais auquel on ne fait évidemment pas subir de chauffage préalable. Toutes les mesures d'absorption sont faites à *p*H = 2,2. On obtient dans les deux cas une courbe qui, après un palier jusque vers *p*H = 2,5, descend régulièrement jusque pour *p*H = 5. Après quoi il se superpose un deuxième phénomène, qui est l'apparition de « corps R » pour des *p*H supérieurs à 5, et la courbe remonte.

Précipitation du « corps R » par la dinitrophénylhydrazine. — Il n'est pas possible, sans connaître exactement la nature du « corps R », d'en proposer un dosage. Néanmoins, il est possible d'estimer la part pour laquelle il entre dans le dosage, par les dinitrophénylhydrazones, des composés carbonyles d'un vin.

Nous avons vu, à la fin du chapitre précédent, que le « corps R » est précipité par la dinitrophénylhydrazine et par ce moyen est dosé avec les monoacides type acide glyoxylique.

Nous avons traité un vin, à *p*H = 7 et en milieu alcoolique à 50 p. 100, par la baryte en solution saturée, afin de précipiter les diacides (acides tartrique et mésoxalique). Après filtration, le vin est distillé sous vide pour chasser les aldéhydes volatils (aldéhyde acétique) et le diacétyle; nous voyons maintenant pourquoi il faut faire cette distillation à *p*H inférieur à 4,5 : c'est afin d'éviter l'apparition de nouvelles quantités de « corps R ».

Il ne reste plus en solution que les monoacides, les aldéhydes fixes et le « corps R ». On neutralise à *p*H = 7 et on défèque par le sous-acétate de plomb. Le précipité plombique renferme les monoacides et le « corps R ». Ce précipité, filtré et lavé, est redissous dans l'acide acétique.

On neutralise et on traite par la baryte, mais cette fois en milieu alcoolique à 75-80 p. 100, de façon à précipiter les monoacides. Après une nuit en glacière, on filtre, le filtrat ne contient plus que le « corps R ». Cette solution est alors débarrassée de l'excès de baryte

par SO_4H_2 et de l'alcool par distillation sous vide à $pH = 4$. On complète à volume connu. Sur une partie aliquote, on fait la réaction de la tartrazine; sur le reste, on précipite par la dinitrophénylhydrazine. Le précipité, après 4 jours, est filtré, lavé par ClH 2N, redissous dans le mélange alcool-soude et enfin titré par le trichlorure de titane. De cette façon, on connaît le nombre de microéquivalents de carbonyles dus au « corps R ». De plus, ceci permet d'établir une correspondance entre ce nombre de microéquivalents de carbonyles et la réaction de la tartrazine. C'est ainsi que nous avons établi que 100 µ.éq. de carbonyles dus au « corps R » par litre de vin, correspondent à une absorption de 271,5 dans la réaction de la tartrazine faite sur 10 cm³ de vin ($pH = 4.5$; 60 min de chauffage au bain-marie; tube complété à 20 cm³ après réaction; lecture pour $\lambda = 436$ mµ).

Cette correspondance établie permet d'éviter, à chaque dosage d'un vin, la longue manipulation que nous venons d'exposer : il suffit de faire la réaction de la tartrazine sur le vin (puisque nous savons que finalement le « corps R » est le seul à y donner cette réaction) et de calculer le nombre de microéquivalents de carbonyles qui y correspondent : c'est ce que nous avons fait dans notre dosage à la fin du précédent chapitre.

Pouvoir réducteur du « corps R ». — Tous les vins présentent un pouvoir réducteur, en dehors de celui qui est dû au fer^{++} et au bisulfite. Ce pouvoir réducteur est facile à mettre en évidence par dichlorophénolindophénol.

Nous avons bien souvent mesuré ce pouvoir réducteur sur des vins de Bordeaux les plus divers, et nous avons trouvé le même phénomène sur un vin d'Anjou, qui nous servira ici d'exemple.

a) Pouvoir réducteur instantané : à 10 cm³ de vin, on ajoute 2 cm³ de formol concentré pour bloquer le pouvoir réducteur du bisulfite, puis on titre par le dichlorophénolindophénol N/1 000; on trouve 10,8 cm³.

On refait le même dosage mais en bloquant le fer^{++} par un excès de cyanure de potassium, en milieu bicarbonaté, ainsi que l'ont indiqué Genevois et Cayrol : 10 cm³ de vin + 2 cm³ de formol + CO_3HNa en excès + 10 cm³ KCN N/10; on attend 5 min et on titre : on ne trouve plus de pouvoir réducteur; celui que nous avons précédemment trouvé est donc dû uniquement au fer^{++}; en effet, si on dose le fer^{++} par la réaction de l'α-α′ dipyridyle, on trouve que le vin est 1,07 N/1 000 en fer^{++} et nous avions trouvé un pouvoir réducteur 1,08 N/1 000.

b) Pouvoir réducteur total : à 10 cm³ de vin formolé, on ajoute 25 cm³ de dichlorophénolindophénol N/1 000, on attend 1 heure et on titre l'excès de colorant par l'acide ascorbique N/1 000; on trouve ainsi

un pouvoir réducteur de 1,58 milliéquivalent par litre. Si on en déduit 1,08 m.éq dû au fer, on constate que le vin renferme un corps réducteur lent, à la concentration 0,5 N/1 000.

Si par ailleurs nous dosons le « corps R » par la réaction de la tartrazine, nous le trouvons à la concentration de 0,53 N/1 000 : cette concordance nous autorise à penser qu'il s'agit d'un seul et même corps.

Nature du « corps R ». — Nous savons qu'il ne s'agit ni d'acide dioxytartrique ou dihydroxymaléique, ni d'acide ascorbique ou ses dérivés, ni de réductone, ni de glyoxal ou homologues (méthylglyoxal et diacétyle). Les glucides donnent une très légère réaction, différente mais pour le moment, inséparable de celle du « corps R ».

Nous pensons qu'il s'agit d'un produit de dégradation des glucides, puisqu'il s'en forme à partir de ces derniers par chauffage à *p*H supérieur à 4,7 ou par fermentation : la similitude des courbes obtenues à partir du vin et à partir du glucose semble bien montrer qu'il s'agit du même corps, ou de deux corps très voisins.

De ses propriétés, nous avons pu seulement établir qu'il s'agit d'un corps thermostable, quel que soit le *p*H (tout au moins de 1 à 7), qu'il n'est pas entraînable à la vapeur ; il est précipitable en milieu neutre par le sous-acétate de plomb ; il n'est pas extrait par le pentanol, l'éther, l'acétate d'éthyle ; il n'est pas adsorbé à *p*H = 7 par le charbon actif.

Le « corps R » et le potentiel d'oxydoréduction des vins. — Sur la question du potentiel d'oxydoréduction en œnologie, plusieurs théories sont proposées au sujet des substances qui, par leur propriété de fixer et ensuite de restituer l'oxygène dissous, concourent à imposer au vin un potentiel redox défini.

Geloso, sans être très fixé sur la nature des complexes actifs, pense qu'ils sont identiques à ceux que Wurmser et ses élèves ont étudiés dans les solutions de glucides évolués (on trouvera de nombreuses références bibliographiques sur cette question dans la mise au point de Graff en 1950) :

$$\text{Glucose} \rightarrow G_1 \rightarrow G' \rightarrow A + H_2.$$

Dans ce système, G_1 serait la réductone, G' la redoxine ; pour cette dernière Geloso a trouvé une concentration de l'ordre de 10^{-4} molécule d'hydrogène.

Il est difficile de prendre parti pour l'une ou pour l'autre de ces théories ; néanmoins, le fait que nous n'ayons pu mettre en évidence dans les vins ni acide dihydroxymaléique, ni acide dioxytartrique, et que par contre nous y trouvons des dérivés glucidiques, nous fait évidemment pencher en faveur de la théorie de Geloso.

En fait c'est là une question fort délicate ; il s'agit, d'une théorie à l'autre, de corps très voisins ayant le même groupe fonctionnel diénolique et que l'on trouve à des doses très faibles : quelques dixièmes de millimolécule par litre. Si notre travail plaide en faveur de la théorie de Geloso, il serait pour le moins prématuré de conclure définitivement, et l'utilisation d'autres techniques apportera peut-être la solution, ou pourquoi pas, une troisième hypothèse.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Nous étant fixé pour tâche l'étude de l'évolution de l'acide tartrique, sous l'effet catalytique des sels ferreux, nous avons tout d'abord étudié en détail le comportement de l'acide dihydroxymaléique, qui en est le premier terme. Nous avons mis en évidence les formes cétonique et diénolique de cet acide, et montré qu'il existe un équilibre en proportions définies de chacune de ces formes, mais l'acide réagissant entièrement tantôt comme diénol, tantôt comme cétone, selon le réactif utilisé.

Nous avons montré la grande instabilité de l'acide dihydroxymaléique, catalysée par le cuivre, et qui est due à deux phénomènes : la décarboxylation, conduisant à l'aldéhyde glycolique par l'intermédiaire de l'acide réductonique, et l'oxydation qui mène principalement à l'acide glycolique et à l'acide dioxytartrique.

Cet acide est lui-même très instable, sa décarboxylation donne naissance à l'acide glyoxcylarbonique et au glyoxal, tandis que son oxydation aboutit à l'acide oxalique par l'intermédiaire de l'acide mésoxalique et de l'acide glyoxylique. Nous avons suivi cette dégradation en fonction du temps et du *p*H et nous avons insisté sur le rôle catalytique considérable que jouent le cuivre et le fer dans cette dégradation.

Toujours à propos de l'acide dioxytartrique, nous avons étudié en détail la réaction de la tartrazine ; conditions de temps de chauffage et de *p*H, vérification de la loi de Beer-Lambert, courbe d'étalonnage.

Ayant caractérisé et dosé, en solutions simples, les corps en C_3 et C_2 issus des acides dioxytartrique et dihydroxymaléique, nous avons, par des techniques appropriées, dosé ces corps dans les solutions de tartrate ferreux, en montrant l'influence de l'éclairement, de l'aération et de la température sur l'évolution de ces solutions.

Enfin, nous avons appliqué ces résultats à l'étude des vins, dans lesquels nous n'avons pu caractériser ni l'acide dioxytartrique, ni l'acide dihydroxymaléique, bien que nous y ayons trouvé leurs dérivés en C_3 ou C_2. Par contre, nos recherches ont abouti à la caractérisation, dans le vin, d'un « corps R » donnant la réaction de la tartra-

zine et différent de l'acide dioxytartrique. Nous avons montré que de tels composés prennent naissance soit dans le vin, soit dans une solution de glucose, par chauffage à *p*H supérieur à 4,7-4,8 ou bien encore par fermentation du glucose ; il s'agit vraisemblablement d'un dérivé glucidique, analogue à la réductone d'Euler, précipitable par le sous-acétate de plomb comme elle mais non par le baryum ; il n'est pas extractible par les solvants tels que l'éther, l'acétate d'éthyle ; il résiste parfaitement à l'ébullition mais n'est pas entraînable par la vapeur d'eau. Il précipite par la dinitrophénylhydrazine, ce qui nous a permis d'établir un rapport entre la réaction de la tartrazine et le nombre de microéquivalents de fonction carbonyle.

Dans l'état actuel de nos recherches, ce « corps R » est dosé avec la réductone. La connaissance de sa constitution présenterait un grand intérêt du point de vue du potentiel d'oxydo-réduction des vins.

*
* *

Nous avons fait le tour de la question de l'évolution de l'acide tartrique ; nous avons tenté de faire une synthèse des travaux antérieurs et de mettre en œuvre des techniques permettant l'étude des milieux biologiques où peut se passer cette évolution. Pour ce dernier cas, nos résultats ont été négatifs, en ce sens que si dans les vins nous avons pu mettre en évidence en quantité très faible, l'aldéhyde glycolique, l'acide mésoxalique, l'acide glyoxylique, par contre nous n'avons jamais trouvé leurs précurseurs en C_4 : acides dihydroxymaléique et dioxytartrique. Pourtant, le vin renferme et acide tartrique et sels ferreux nécessaires à leur élaboration. On pourrait penser que ces corps se forment, transitoirement, et sont immédiatement détruits, sous l'effet catalytique du fer et du cuivre ; ceci est certainement exact, puisque de l'acide dioxytartrique ajouté à un vin y est très rapidement détruit. Mais ce phénomène n'explique pas tout, et même doit n'avoir qu'une importance très minime, car il aboutirait à l'accumulation d'acide oxalique qui, on le sait, est absent des vins. Peut-être faut-il invoquer l'obscurité, puisque nous avons vu qu'elle est néfaste à la formation de l'acide dioxytartrique ; peut-être le manque d'oxygène intervient-il aussi : malgré les soutirages et avec la présence de véritables anti oxygènes (polyphénols), la proportion d'oxygène dissous reste assez faible.

BIBLIOGRAPHIE

Ball. — *J. Biol. Chem.*, 1937, **118**, 219.
Baraud. — *Bull. Soc. Chim.*, 1951, **18**, 837 ; 1953, **20**, 521 ; 1953, **20**, 525.
Benrath. — *Journ. of Prakt. Ch.*, 1917, **96**, 190 ; *Bull. Soc. Chim.*, 1920, **28**, 215.

BERGMANN et WOLFF. — *Ber.*, 1923, **56**, 1060.
BRADY. — *J. Chem. Soc.*, 1931, **134**, 756.
BIRCH et HARRIS. — *Biochem. J.*, 1933, **27**, 595.
BRYANT et SMITH. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1935, **57**, 57.
CHATTAWAY et HARRIS. — *J. Chem. Soc.*, 1922, **121**, 2703.
GLAGETT, TOLBERT, BURRIS. — *J. Biol. Chem.*, 1949, **178**, 977.
FEARON. — *Biochem. J.*, 1920, **14**, 548; *Bull. Soc. Chim.*, 1921, **30**, 965.
FENTON. — *Chemical News*, 1876, **33**, 190; 1881, **43**, 110.
FENTON. — *J. Chem. Soc.*, 1894, **65**, 899; 1895, **67**, 48; 1895, **67**, 774; 1896 **69**, 546; 1897, **71**, 375; 1898, **73**, 71; 1898, **74**, 119; 1899, **75**, 10; 1900 **77**, 69; 1905, **87**, 804.
FENTON et JONES. — *J. Chem. Soc.*, 1901, **79**, 91.
FENTON et RYFFEL. — *J. Chem. Soc.*, 1902, **81**, 426.
FOSSE et HIEULLE. — *C. R.*, 1924, 179, 636.
FRANGEN et HELWERT. — *Bioch. Zetschr.*, 1923, **135**, 391.
GATET et GENEVOIS. — *Bull. Soc. Chim.*, 1941, **8**, 485.
GELOSO. — *Ann. Brass. Dist.*, février, mars, mai 1931.
GENEVOIS. — *Chim. Anal.*, 1947, 29, 53 et 77.
GENEVOIS et CAYROL. — *Enzymologia*, 1939, **6**, 352.
GENEVOIS et GAY. — *Soc. Sc. Phys. et Nat. Bordeaux*, 2 février 1939.
GENEVOIS et RIBEREAU-GAYON. — *Le vin*, 1947 (Hermann, édit., Paris).
GOSH et MUCKHERJEE. — *J. Ind. Chem. Soc.*, 1925, **2**, 165.
GRAFF. — *Ann. Nutr. Aliment.*, 1950, **4**, 253.
HERBERT, HIRST, PERCIVAL, REYNOLDS et SMITH. — *J. Chem. Soc.*, 1933, **2**, 1270.
KUMLER et DANIELS. — *J. Am. Chem. Soc*, 1935, **57**, 1929.
KUN. — *J. Biol. Chem.*, 1952, **194**, 603.
LACHMAN. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1921, **43**, 577.
NEUBERG et SCHWENK. — *B. Z.*, 1915, **71**, 104.
PESEZ et POIRIER. — *Méthodes et réactions de l'analyse organique*, 1953, **2**, Masson, édit.
PEYNAUD et LAFON. — *Ann. Fafs. et Fraudes*, octobre-décembre 1951,
PONS. — *Thèse doctorat*, Montpellier, 1949.
RIBEREAU-GAYON. — *Contribution à l'étude des oxydations et réductions dans les vins*, Delmas, édit., Bordeaux, 1933.
RIBEREAU-GAYON. — *Transformation et traitement des vins*, Béranger, édit., Paris-Liège, 1947.
SCHMALFUSS. — *H. S.*, 1923, **131**, 166; 1924, **138**, 156.
SCHMALFUSS et BARTHMEYER. — *H. S.*, 1926, **160**, 196.
SIVOHNEN. — *Acta Acad. Sc. Fenn.*, 1901, **16**, 1.
TOLBERT, CLAGETT et BURRIS. — *J. Biol. Chem*, 1949, **181**, 905.
TOLLENS. — *Bull. Soc. Chim.*, 1909, **6**, 616.
WARBURG. — *Z. Physiol. Chemie*, 1914, **92**, 231.
WIELAND et FRANKE. — *Liebigs Ann.*, 1928, **464**, 101.
ZELITCH. — *J. Biol. Chem.*, 1953, **201**, 719.
ZELITCH et OCHOA. — *J. Biol. Chem.*, 1953, **201**, 709.
ZIEGLER et LACHER. — *Ber.*, 1887, **20**, 836.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Les pigments des Insectes.

VU ET APPROUVÉ :

Bordeaux, le 9 mars 1954.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

G. BRUS.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Bordeaux, le 11 mars 1954.

Pour le Recteur de l'Académie,
le Vice-Président du Conseil de l'Université,

A. GARRIGOU-LAGRANGE.

DÉPÔT LÉGAL : 1954, 4e TRIMESTRE, N° D'ORDRE 2065, MASSON ET Cie, ÉDITEURS, PARIS
BARNÉOUD FRÈRES ET Cie, IMPRIMEURS (31.0566), LAVAL, N° 3005. — 10-1954.